

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Veronika Kalendová

**Charakterizace metabolických účinků omega-3 mastných kyselin u transgenních
myši s expresí humánního PPAR α**

**Characterization of metabolic effects of dietary omega-3 fatty acids in transgenic
PPAR α -humanized mice**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: MUDr. Martin Rossmeisl, Ph. D.

Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.
Oddělení biologie tukové tkáně

Praha 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením MUDr. Martina Rossmeisla, Ph.D. ve Fyziologickém ústavu AV ČR v.v.i. za použití dále uvedené literatury. Dále prohlašuji že jsem tuto práci ani žádnou její část nepoužila k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 2. 5. 2017

.....
Veronika Kalendová

Poděkování:

Děkuji svému školiteli MUDr. Martinu Rossmeislovi, Ph.D. za obětavost, trpělivost a odborné vedení mé diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala všem kolegům z Oddělení biologie tukové tkáně FGÚ AV ČR, v.v.i. za poskytnutou pomoc, ochotu a přátelské prostředí. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za veškerou podporu a pevné zázemí během mého studia.

Abstrakt

Obezita je úzce spojena s výskytem řady metabolických onemocnění včetně inzulinové rezistence, diabetu 2. typu nebo dyslipidemie. Receptor aktivovaný peroxisomálními proliferátory (PPAR)- α patří mezi klíčové transkripční faktory regulující lipidový metabolismus a jeho aktivitu stimulují i některá hypolipidemická léčiva. Mezi endogenní ligandy PPAR α se řadí n-3 polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) včetně eikosapentaenové kyseliny (EPA) a dokosahexaenové kyseliny (DHA), které se ve formě rybího oleje stále používají jako potravní doplňky za účelem snižování hladiny lipidů v cirkulaci a v prevenci kardiovaskulárních onemocnění. Relativně novou lipidovou formou EPA a DHA jsou i estery vosku, které by na základě nedávno publikovaných studií mohly být účinnější než klasický rybí olej, tj. triacylglyceroly. V experimentu byly použity myši inbredního kmene 129S1/SvImJ, a to jednak jako kontrolní wild type (WT) kmen, a dále jako transgenní myši exprimující výlučně humánní PPAR α (hPPAR α) nebo transgenní myši s absencí PPAR α (PPAR α -KO). Myšim byly podávány po dobu 8 týdnů experimentální diety: (i) kontrolní, nízkotuková dieta, (ii) obezogenní vysokotuková dieta (CHF), a (iii) CHF dieta suplementovaná koncentrátem n-3 PUFA ve formě esterů vosku izolovaných ze zooplanktonu *Calanus finmarchicus* (ω 3Cal). V průběhu pokusu byl proveden intraperitoneální glukózový toleranční test a odběr plasmy v postprandiálním stavu, v plasmě a tkáních pak byly měřeny koncentrace lipidových metabolitů. Podávání ω 3Cal diety ovlivnilo metabolické parametry pouze u PPAR α -KO myší, u kterých došlo ke snížení hmotnostního přírůstku a obsahu tělesného tuku. Vliv ω 3Cal diety se projevil i na úrovni snížení akumulace lipidů v játrech a hladin celkového cholesterolu a non-HDL cholesterolu v plasmě, a dále snížením lačné glykémie. Všechny skupiny WT kmene se od hPPAR α myší lišily pouze nižší glykemií nalačno a sníženou glukózovou tolerancí. Benefiční účinky ω 3Cal suplementace pozorované pouze u PPAR α -KO myší naznačují, že v případě této nové lipidové formy EPA/DHA se zřejmě uplatňují doposud neidentifikované alternativní mechanismy nezávislé na stimulaci transkripčního faktoru PPAR α . Je také možné, že nižší citlivost myšího kmene 129S1/SvImJ k obezogenním účinkům CHF diety neumožňuje odhalit potenciální benefiční účinky ω 3Cal suplementace také u WT a PPAR α -KO myší.

Klíčová slova:

obezita, n-3 polynenasycené mastné kyseliny, vysokotuková dieta, PPAR α , estery vosku

Abstract

Obesity is tightly connected with metabolic diseases including insulin resistance, type 2 diabetes or dyslipidemia. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- α is a key transcription factor involved in the regulation of lipid metabolism, while its activity is stimulated by a variety of hypolipidemic drugs. n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA), including eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acid, are endogenous ligands of PPAR α , and they are used in the form of fish oil as dietary supplements in order to lower blood lipid levels and to prevent cardiovascular disease. Wax esters represent a novel lipid form of EPA and DHA, and according to recent studies they could exert more potent effects than the classical fish oil (i.e. triacylglycerols). Mice of the 129S1/SvImJ inbred strain were used in the present experiment, and included wild-type (WT) mice, as well as transgenic mice either with the exclusive expression of the human form of PPAR α (hPPAR α) or mice completely lacking PPAR α (PPAR α -KO). Mice were fed for 8 weeks the following diets: (i) a control low-fat diet, (ii) obesogenic high-fat diet (cHF), and (iii) the cHF diet supplemented with the n-3 PUFA concentrate in the form of wax esters isolated from marine zooplankton *Calanus finmarchicus* (ω 3Cal). Mice were subjected to intraperitoneal glucose tolerance test, while blood was collected in the postprandial state, followed by the measurement of lipid metabolites in plasma and tissues. Administration of ω 3Cal diet affected metabolic parameters only in PPAR α -KO mice, in which body weight gain and adiposity were reduced. The effect of ω 3Cal intervention was also revealed at the level of reduced lipid accumulation in the liver and reduced total as well as non-HDL cholesterol in plasma, and by lowering of fasting glycemia. All groups of WT mice differed from hPPAR α mice only by having lower fasting glycemia and reduced glucose tolerance. Beneficial effects of ω 3Cal supplementation observed exclusively in PPAR α -KO mice suggest that there might be so far unidentified alternative mechanisms of action involved in the effects of this novel lipid form of EPA/DHA, which are independent of PPAR α . It is also possible that a lower sensitivity of the 129S1/SvImJ mouse strain to obesogenic effects of the cHF diet does not enable to reveal potential beneficial effects of ω 3Cal supplementation also in the WT and PPAR α -KO mice.

Key words:

obesity, n-3 polyunsaturated fatty acids, high-fat diet, PPAR α , wax esters

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Literární přehled.....	3
2.1 Obezita a metabolický syndrom	3
2.2 Expanze tukové tkáně a změny v jejím sekrečním profilu při obezitě	4
2.3 Inzulín, IR a metabolismus glukózy	5
2.4 Zvýšené hladiny mastných kyselin a ektopické ukládání tuků při obezitě a IR..	8
2.5 Rozvoj chronického subklinického zánětu při obezitě	11
2.6 Léčba obezity	14
2.7 Vliv složení stravy a typu lipidů na metabolismus, n-3 PUFA	15
2.8 PPAR α	20
2.9 Myší modely založené na PPAR α	22
2.10 Odlišnosti myšího a humánního PPAR α	24
3. Cíle diplomové práce.....	26
4. Metody.....	28
4.1 Materiál	28
4.1.1 Chemikálie	28
4.1.2 Přístroje a materiál	28
4.2 Laboratorní zvířata a jejich chov	29
4.3 Průběh experimentu, experimentální diety	30
4.4 Ukončení pokusu, odběr a skladování biologického materiálu	31
4.5 Genotypizace	31
4.5.1 Izolace DNA	31
4.5.2 PCR.....	31
4.5.3 Gelová elektroforéza.....	33
4.6 Intraperitoneální glukózový toleranční test	34
4.7 Odběr krve v postprandiálním stavu.....	35
4.8 Stanovení lipidů a cholesterolu v plasmě	36

4.8.1 TAG	36
4.8.2 Cholesterol.....	37
4.8.3 HDL-cholesterol	37
4.8.4 NEFA.....	38
4.9 Stanovení lipidů ve tkáni	39
4.10 Statistické vyhodnocení	40
5. Výsledky	41
5.1 Přírůstek tělesné hmotnosti a spotřeba diety	41
5.2 Intraperitoneální glukózový toleranční test	44
5.3 Analýza tkání <i>ex vivo</i>	48
5.4 Lipidové metabolity v plasmě	50
5.5 Metabolická flexibilita.....	51
6. Diskuse	59
6.1 Genotypizační protokol	59
6.2 Hmotnostní přírůstek a účinek ω 3Cal	59
6.3 Vliv ω 3Cal na glukózovou homeostázu	61
6.4 Vliv ω 3Cal na lipidový metabolismus.....	62
7. Závěr.....	64
8. Seznam použité literatury.....	65

Seznam použitých zkratek

ALA	kyselina α -linolenová (<i>α-linolenic acid</i>)
AMPK	AMP-aktivovaná protein kináza
aP2/FABP4	adipocytární protein 2 (<i>adipocyte protein 2 / fatty acid binding protein 4</i>)
Apo	apolipoprotein
ATGL	lipáza triacylglycerolů v tukové tkáni (<i>adipose triglyceride lipase</i>)
AUC	plocha pod křivkou (<i>area under the curve</i>)
BAT	hnědá tuková tkáň (<i>brown adipose tissue</i>)
BMI	(<i>body mass index</i>)
CCL2	chemokinový ligand 2 (<i>chemokine (C-C motif) ligand 2</i>)
CD	(<i>cluster of differentiation</i>)
cHF	vysokotuková dieta
ChREBP	(<i>carbohydrate response element binding protein</i>)
Chow	kontrolní nízkotuková dieta
CoA	koenzym A (<i>coenzyme A</i>)
DAG	diacylglycerol
DHA	dokosaheptaenová kyselina (<i>docosahexaenoic acid</i>)
EPA	eikosapentaenová kyselina (<i>eicosapentaenoic acid</i>)
FAS	syntáza mastných kyselin (<i>fatty acid synthase</i>)
FBG	glykémie nalačno (<i>fasting blood glucose</i>)
FFAR	receptor volných mastných kyselin (<i>free fatty acid receptor</i>)
GLUT	glukózový transportér
HDL	lipoprotein s vysokou hustotou (<i>high-density lipoprotein</i>)
HOMA	(<i>homeostatic model assessment</i>)
hPPAR α	humánní PPAR α (<i>humanized PPARα</i>)
HSL	hormon-senzitivní lipáza
IAPP	(<i>islet amyloid polypeptide</i>)
IKK	inhibitor of κ B kinase
IL	interleukin
IPGTT	intraperitoneální glukózový toleranční test
IR	inzulínová rezistence
IRS-1	substrát inzulínového receptoru-1 (<i>insulin receptor substrate-1</i>)
JNK	(<i>c-Jun N-terminal kinase</i>)
KO	knockout
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou (<i>low-density lipoprotein</i>)
LPL	lipoproteinová lipáza
MAPK	mitogeny aktivovaná protein kináza
MK	mastná kyselina
mTORC1	(<i>mammalian target of rapamycin complex 1</i>)
NEFA	nenasyčená mastná kyselina
NF κ B	nukleární faktor κ B (<i>nuclear factor κB</i>)
NLRP3	(<i>nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor with pyrin N-terminal domain 3</i>)
PAI-1	(<i>plasminogen activator inhibitor-1</i>)
PKC	protein kináza C
PPAR	receptor aktivovaný peroxisomálními proliferátory (<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>)
PUFA	polynenasycená mastná kyselina (<i>polyunsaturated fatty acid</i>)

ROS	kyslíkové radikály (<i>reactive oxygen species</i>)
SOCS-3	(<i>suppressor of cytokine signaling – 3</i>)
SREBP	(<i>sterol regulatory element binding protein</i>)
STAT	(<i>signal transducer and activator of transcription</i>)
T2D	diabetes 2. typu (<i>type 2. diabetes</i>)
TAG	triacylglycerol
TLR	(<i>toll-like receptor</i>)
TNFR	receptor tumor-nekrotizujícího faktoru (<i>tumour necrosis factor receptor</i>)
TNF- α	tumor-nekrotizující faktor- α (<i>tumor necrosis factor-α</i>)
UCP1	rozpřahující protein 1 (<i>uncoupling protein 1</i>)
VLDL	lipoprotein s velmi nízkou hustotou (<i>very low-density lipoprotein</i>)
WT	wild type
ω 3Cal	koncentrát n-3 PUFA z <i>Calanus finmarchicus</i>

1. Úvod

Obezita se řadí mezi nejčastější metabolické choroby a její výskyt je označován za globální epidemii. Česká republika se v posledních letech dostává do popředí evropských států s nejvyšším výskytem nadváhy a obezity. S obezitou jsou spojovány závažné zdravotní problémy včetně hypertenze, inzulinové rezistence (IR) nebo diabetu 2. typu (T2D), a společně s dalšími chorobami bývá jejich současný výskyt označován jako metabolický syndrom. Metabolický syndrom pak představuje rizikový faktor v rozvoji kardiovaskulárních chorob, které stále zůstávají jednou z nejčastějších příčin úmrtí ve vyspělých státech světa. Příčinou obezity bývá kromě genetické predispozice především nezdravý životní styl zakládající se na nízké fyzické aktivitě, nadměrném kalorickém příjmu a nezdravé stravě. Právě kvalita přijímané stravy bývá často podceňována. Podstatnou roli hraje složení lipidů ve stravě, ve které v případě typické „západní diety“ převažují nasycené mastné kyseliny (MK) a polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) řady n-6, jejichž příjem je spojován s častějším rozvojem obezity a metabolických komplikací. Naproti tomu v malém množství bývají přijímány n-3 PUFA, které vykazují naopak benefiční účinky z hlediska potlačení rozvoje zánětu, kardiovaskulárních onemocnění či akumulace tukové tkáně. n-3 PUFA se ve zvýšené míře vyskytují v rostlinných olejích anebo tučných mořských rybách a fytoplanktonu. Mezi nejvýznamnější zástupce n-3 PUFA se řadí kyselina eikosapentaenová (EPA; 20:5n-3) a kyselina dokosaheptaenová (DHA; 22:6n-3), které pocházejí především z mořských zdrojů. Poměrně málo prozkoumaným zdrojem EPA a DHA je zooplankton *Calanus finmarchicus*, ve kterém jsou n-3 PUFA vázány v méně obvyklé formě esterů vosku.

Obezita je doprovázena poruchami metabolismu glukózy a lipidů, které mohou být benefičně ovlivněny podáváním EPA a DHA dietou. Jedním z mechanismů účinku n-3 PUFA v organismu je stimulace katabolismu mastných kyselin, a to prostřednictvím aktivace transkripčního faktoru receptor aktivovaný peroxisomálními proliferátory (PPAR)- α , který je exprimovaný především v játrech. Na PPAR α je také cílen účinek řady hypolipidemických léčiv. Regulace exprese pomocí transkripčního faktoru PPAR α však vykazuje mezidruhové rozdíly v případě srovnání myšího a lidského receptoru. Pro objasnění případných mezidruhových rozdílů v regulaci PPAR α -dependentních procesů byly vyvinuty různé transgenní myší modely. Cílem této práce bylo studium transgenního myšího modelu s celotělovou expresí výlučně humánní formy PPAR α , a to jednak v kontextu

rozvoje obezity indukované dlouhodobým podáváním vysokotukové diety, a dále v rámci charakterizace metabolických účinků dietní intervence pomocí n-3 PUFA ve formě esterů vosku izolovaných z *Calanus finmarchicus*.

2. Literární přehled

2.1 Obezita a metabolický syndrom

Obezita je definována jako nadměrná akumulace tuku, která může být spojena s řadou metabolických poruch. Nejčastěji vzniká jako následek kombinace nadměrného energetického příjmu a nízké fyzické aktivity. Pro běžné orientační stanovení obezity slouží výpočet indexu BMI (v angličtině – body mass index), který je podílem hmotnosti a druhé mocniny výšky pacienta. Obezita je pak definována jako BMI vyšší než 30, BMI v rozmezí 25-30 značí nadváhu. Obezita může být rovněž stanovena na základě obvodu pasu, který lépe vypovídá o možných zdravotních rizicích. U žen by obvod pasu neměl přesahovat 80 cm, u mužů 94 cm (Holt, 2005). Oproti typicky ženskému ukládání tukové tkáně na periferii především v oblasti boků, hýždí a stehů je právě centrální obezita s akumulací tukové tkáně v abdominální oblasti spojena s častější přítomností přidružených metabolických poruch. Mezi tyto poruchy patří vysoký krevní tlak, IR, zvýšené systémové hladiny glukózy (glykémie), triacylglycerolů (TAG), lipoproteinových částic s velmi nízkou hustotou (VLDL) a malých lipoproteinových částic s nízkou hustotou (LDL), případně snížené hladiny lipoproteinových částic s vysokou hustotou (HDL), které transportují cholesterol zpět do jater. Společný výskyt těchto poruch při obezitě je označován termínem „metabolický syndrom“, který značí zvýšené riziko rozvoje aterosklerózy, T2D či jaterní steatózy. Diagnóza metabolického syndromu je u pacientů založena na přítomnosti abdominálního typu obezity za současného výskytu alespoň dvou z následujících kritérií: TAG v plasmě > 1.7 mmol/l, hypertenze, glykémie na lačno > 5.6 mmol/l nebo T2D, a HDL-cholesterol < 1.1 mmol/l (ženy) a < 0.9 mmol/l (muži). U abdominální obezity je pak určující obvod pasu > 94 cm (muži) nebo > 80 cm (ženy) vztahující se na evropskou populaci (Holt, 2005). Existují i další komponenty metabolického syndromu, které jsou spolu často úzce provázané a podle různých definic mezi ně patří např. inzulinová rezistence, hyperinzulinémie, porucha glukózové tolerance, systémový zánět, sarkopenie či ektopické ukládání tuku.

2.2 Expanze tukové tkáně a změny v jejím sekrečním profilu při obezitě

Tuková tkáň se u většiny savců vyskytuje ve dvou typech, a to jako bílá a hnědá tuková tkáň, které se liší svou stavbou i funkcí. Hnědá tuková tkáň (BAT) je u člověka zastoupena minoritně, adipocyty tvoří více malých tukových kapének a obsahují velké množství mitochondrií. BAT je specifická produkcí rozpřahujícího proteinu 1 (UCP1), který v mitochondriích rozpřahuje oxidativní fosforylaci za současné tvorby tepla, díky čemuž může sloužit především u novorozenců a hibernujících savců jako termogenní orgán. Naopak tukové buňky (tj. adipocyty) bílé tukové tkáně slouží především k ukládání přebytečné energie ve formě TAG v tukových kapénkách, které zpravidla splývají v jednu velkou kapénku. Bílá tuková tkáň kromě ukládání energie současně funguje i jako izolační vrstva a především jako orgán s endokrinní i parakrinní funkcí.

S nadměrnou akumulací bílé tukové tkáně při obezitě je spojena dysregulace sekreční funkce a chronický zánět především viscerálního (útrobního) tukového depa, které se zvětšuje především na základě hypertrofie adipocytů. Hypertrofované adipocyty jsou mnohem náchylnější k rozvoji lokální hypoxie vedoucí k oxidativnímu stresu, stresové odpovědi endoplazmatického retikula a buněčné smrti, což ve svém důsledku vede k infiltraci tukové tkáně makrofágy (Sun et al., 2011). Počet makrofágů v tukové tkáni při obezitě značně stoupá, u obézních pacientů mohou tvořit až 40 % buněk subkutánního tukového depa (Weisberg et al., 2003). Makrofágy pak často obklopují odumřelé buňky, čímž vytváří typická uskupení, tzv. crown-like structures (Gericke et al., 2015). Dochází k rozvoji mírného chronického zánětu a do cirkulace se tak ve větší míře uvolňuje řada prozánětlivých faktorů, jako jsou tumor-nekrotizující faktor- α (TNF- α) nebo chemokinový ligand 2 (CCL2). CCL2 je chemotaktický protein stimulující migraci monocytů a dalších imunitních buněk do místa zánětu. Společně s TNF- α a dalšími prozánětlivými cytokiny kromě stimulace zánětlivé odpovědi také narušují inzulínovou signální kaskádu a napomáhají rozvoji inzulínové rezistence (Uysal et al., 1997); (Sartipy and Loskutoff, 2003). V subkutánní tukové tkáni však mohou převažovat makrofágy typu M2 působící protizánětlivě a podporující rozvoj kapilární sítě (Bourlier et al., 2008).

Rezistence se vyvíjí i pro anorexigenní hormon leptin produkovaný především adipocyty. Jeho produkce se zvyšujícím se množstvím tukové tkáně narůstá a za fyziologických podmínek signalizuje dostatek energetických zásob, kdy centrálním působením omezuje příjem potravy a zvyšuje energetický výdej. Sekrece leptinu je stimulována např. inzulínem či TNF- α , a inhibována hladověním i volnými MK (Margetic

et al., 2002). V periferních orgánech leptin stimuluje β -oxidaci MK, především díky aktivaci buněčného energetického sensoru AMP-aktivované protein kinázy (AMPK) a zvýšením genové exprese transkripčního faktoru PPAR α (Lee et al., 2006). Dlouhodobě zvýšené hladiny leptinu však způsobují leptinovou rezistenci narušením leptinové signalizační kaskády na periférii i v centrálním nervovém systému, přičemž v centrálním nervovém systému na úrovni nucleus arcuatus hypotalamu vede leptinová rezistence ke sníženému účinku leptinu na snižování příjmu potravy (Balland and Cowley, 2015).

Adiponektin je dalším důležitým hormonem, který je v organismu produkován převážně adipocyty tukové tkáně a který ovlivňuje energetický metabolismus v cílových tkáních hlavně díky stimulaci AMPK (viz výše), což má za následek inhibici energeticky náročných procesů a naopak stimulaci těch procesů, které vedou k tvorbě buněčného ATP. Adiponektin stimuluje β -oxidaci MK v játrech a kosterním svalu, zvyšuje utilizaci glukózy, a v játrech inhibuje glukoneogenezi (Novikova et al., 2015). Jeho účinek zahrnuje i snižování hladin TNF- α , působí protizánětlivě, brání rozvoji aterosklerózy, a také stimuluje angiogenezi a zlepšuje inzulínovou senzitivitu (Ouchi et al., 1999); (Yokota et al., 2000); (Adams et al., 2013). Při obezitě a inzulínové rezistenci však jeho hladiny v cirkulaci klesají (Fantuzzi, 2013).

2.3 Inzulín, IR a metabolismus glukózy

Inzulín je důležitým hormonem uplatňujícím se v regulaci celotělového metabolismu. Ve stavu sytosti slouží jako hlavní zdroje energie glukóza a MK. Zvýšené cirkulující hladiny glukózy i MK nebo aminokyselin v postprandiálním stavu aktivují v β -buňkách pankreatu výlev inzulínu, který podporuje vstřebávání glukózy z cirkulace do tkání a tlumí její produkci v játrech, ledvinách i tenkém střevě (Prentki et al., 2013). Vstup glukózy do tkání jako je kosterní sval nebo do adipocytů je zprostředkován glukózovým transportérem (GLUT)-4, jehož translokace na buněčnou membránu je aktivována inzulínem. Inzulín v játrech v postprandiálním stavu potlačuje glukoneogenezi a glykogenolýzu inhibicí enzymů glukóza-6-fosfatázy a fosfoenolpyruvát karboxykinázy, naopak stimulována je *de novo* lipogeneze transkripčními faktory sterol regulatory element binding protein (SREBP)-1c a carbohydrate response element binding protein (ChREBP). Inhibice jaterní produkce glukózy je nejspíš závislá i na inzulínem inhibované lipolýze v tukové tkáni, následované poklesem jaterního acetyl-koenzymu A (CoA) z oxidace MK

a nižší aktivitě pyruvát karboxylázy (Perry et al., 2015). Glukóza může být ve tkáních ukládána ve formě glykogenu, a to především v játrech a v kosterním svalu, anebo může být částečně metabolizována v procesu glykolýzy a její metabolity mohou pak podporovat syntézu TAG především v adipocytech tukové tkáně. Takto uložená energie je naopak mobilizována ve stavu hladovění. Při hladovění hladiny glukózy v cirkulaci klesají, klesá i produkce inzulínu a vstřebávání glukózy do buněk na periférii, díky čemuž může být glukóza jako substrát přednostně využívána v mozku. Z tohoto důvodu je nezbytné udržování dostatečné koncentrace glukózy v cirkulaci, která je zajišťována procesem glukoneogeneze a štěpením glykogenu v játrech, přičemž oba procesy jsou aktivovány hormonem glukagonem. Glukagon je produkován α -buňkami pankreatu a funguje jako antagonist inzulínu, oproti kterému naopak zvyšuje hladiny glukózy v cirkulaci. Při hladovění je rovněž aktivována lipolýza v tukové tkáni a do cirkulace jsou tak ve větší míře uvolňovány glycerol a MK. Vstřebávání MK do buněk a jejich katabolismus je usnadněn mimo jiné díky aktivaci jaderných receptorů PPAR (viz níže). V játrech je tak energie získaná v procesu β -oxidace MK využita např. pro glukoneogenezi či tvorbu ketolátů, které slouží pro řadu buněk jako dostupnější zdroj energie než MK (Hue and Taegtmeyer, 2009). Patří mezi ně i mozková tkáň, která MK jako energetický zdroj nedokáže využít.

Inzulínová rezistence byla považována za prvotní příčinu metabolického syndromu (viz výše) již za dob Reavena (Reaven, 1988). Obezita je pro rozvoj IR největším rizikovým faktorem, u části obézních se však vůbec nemusí projevit, a proto v nejnovějších definicích metabolického syndromu již nefiguruje (Holt, 2005). Nicméně fakt, že IR má úzký patofyziologický vztah k obezitě, hypertenzi a T2D je i nadále platný, a proto je intenzivně studována. V případě IR se jedná o sníženou biologickou odpověď na stimulaci inzulínem, především ve tkáních jako např. kosterní sval, játra, srdce nebo tuková tkáň, čímž dochází k dysregulaci glukózové homeostázy i na celotělové úrovni. Narušení inzulínové signalizační kaskády z důvodu postreceptorového defektu se pak projevuje sníženým vstřebáváním glukózy do buněk kosterního svalu, a současně není dostatečně inhibována glukoneogeneze a produkce glukózy v játrech. Postupně se tak rozvíjí hyperglykémie v postprandiálním a následně i v hladovém stavu. V širším smyslu je IR charakterizována i dysregulací lipidového a proteinového metabolismu, projevující se např. vyšší lipolýzou v adipocytech či poruchou syntézy proteinů vedoucí eventuálně až k sarkopenii (Stephens et al., 2015); (Castro et al., 2014). Míra citlivosti organismu k inzulínu se nejlépe měří pomocí metody hyperinzulinemického-euglykemického zámku (clamp),

kdy se pacientovi pomocí konstantní infuze inzulínu navodí hyperinzulinémie, která má za cíl stimulovat transport glukózy do tkání. V závislosti na citlivosti organismu k inzulínu a míře transportu glukózy do tkání se pak do organismu infunduje tolik glukózy, aby se její hladina v cirkulaci (glykémie) udržovala na konstantní, euglykemické (tj. ~ 5.5 mmol/l) úrovni. Nicméně z důvodu náročnosti tohoto přístupu, který se běžně používá pouze v experimentálních podmínkách, se v praxi využívají alternativní metody, např. tzv. HOMA index (v angličtině – homeostatic model assessment), který se používá pro kvantifikaci míry inzulínové rezistence (HOMA-IR) nebo funkci β -buněk pankreatu. Výsledky založené na HOMA-IR korelují s výsledky dosaženými pomocí clampu, přičemž pro výpočet HOMA-IR je zapotřebí znát hodnoty koncentrace inzulínu a glykémie nalačno (Matthews et al., 1985). Přesnější hodnoty pak lze získat použitím počítačového modelu HOMA2 dostupného od roku 2013 (Hill et al., 2013). HOMA-IR může pomoci i k včasnému odhalení rozvoje hypertenze. Ačkoliv není zatím plně objasněn mechanismus, který se uplatňuje v rozvoji hypertenze za přítomnosti IR, pravděpodobně však souvisí se zadržováním sodných iontů v cirkulaci, aktivací renin-angiotensinového systému, či zvyšováním endoteliální dysfunkce a cévního odporu na periférii i v ledvinách díky vasokonstrikci (Wang et al., 2017).

Proces inzulínem-aktivované translokace GLUT4 na buněčnou membránu v kosterním svalu nebo v adipocytech je ve stavu IR potlačen, což vede k rozvoji hyperglykémie a poruše metabolické a endokrinní funkce tukové tkáně. Glukóza může i při IR nadále vstupovat do jater či pankreatických β -buněk prostřednictvím transportéru GLUT2, který je na inzulínu nezávislý. U IR však jaterní produkce glukózy není inzulínem dostatečně tlumena (viz výše), což přispívá k rozvoji hyperglykémie a následně ke zvýšené stimulaci produkce inzulínu v β -buňkách pankreatu (de Castro and Calder, 2017). Chronicky zvýšené hladiny glukózy a snížená clearance inzulínu především v játrech pak vedou ke stavu hyperinzulinémie (Ader et al., 2014), která může za současného vlivu IR vyústit až v selhávání β -buněk a T2D. Hyperinzulinémie dále prohlubuje IR negativním vlivem na funkci a počet inzulínových receptorů (Shanik et al., 2008), nadměrně stimuluje jaterní *de novo* lipogenezi, která je podporována také stavem hyperglykémie, kdy je glukóza v játrech místo tvorby glykogenu využita pro syntézu TAG. Jaterní produkce TAG potom přispívá k hypertriacylglycerolemii a zvýšení jaterní sekrece VLDL částic. Ke zvýšení *de novo* lipogeneze v jaterních buňkách (hepatocytech) pravděpodobně dochází ještě před rozvojem IR v adipocytech a zvýšenému přísunu volných MK do jater (Petersen et al., 2007).

Dle Turner *et al.* má celotělová IR počátek v narušení inzulínové citlivosti v játrech, současně se vyvíjí i IR v tukové tkáni a až následně u kosterního svalu (Turner et al., 2013).

Při zvýšených hladinách glykémie dochází za fyziologických podmínek v tukové a svalové tkáni k usnadněnému vstřebávání glukózy stimulovanému inzulínem. U většiny buněčných typů však stimulace inzulínem není potřeba a při vysoké extracelulární koncentraci glukózy sníží její transport do buněk pro udržení stálosti vnitřního prostředí. Některé buněčné typy, jako pankreatické β -buňky, neurony či endoteliální buňky, ale tuto schopnost nemají a koncentrace glukózy uvnitř těchto buněk odpovídá koncentracím extracelulárním. Jsou proto velmi náchylné ke glukotoxickému poškození při chronické hyperglykémii.

Častěji tak dochází k rozvoji periferní neuropatie, ohrožené jsou i silně prokrvené orgány s jemnou kapilární sítí jako ledviny či sítnice, u kterých je zvýšené riziko vzniku nefropatie, respektive retinopatie. V buňkách dochází ke zvyšování hladin kyslíkových radikálů (ROS) podporujících oxidační stres, ke zvýšené glykaci proteinů, která je ireverzibilní, mění funkci proteinů a její škodlivé účinky mohou přetrvávat i po vyléčení hyperglykémie (Campos, 2012). K poškození oxidačním stresem jsou velmi náchylné β -buňky pankreatu, jelikož mají poměrně nízkou antioxidační kapacitu (Robertson et al., 2004). Dochází tak k narušení sekrece inzulínu a redukci počtu β -buněk, což dále umocňuje dysfunkční stav glukózové homeostázy a přispívá k rozvoji T2D.

2.4 Zvýšené hladiny mastných kyselin a ektopické ukládání tuků při obezitě a IR

Zvýšené hladiny volných MK v cirkulaci pravděpodobně přispívají k rozvoji IR větší měrou než například zánětlivé procesy probíhající v tukové tkáni (Morigny et al., 2016). Nicméně ne všichni obézní pacienti s IR musí mít nutně zvýšené hladiny MK (McQuaid et al., 2011). Při obezitě většinou dochází ke zvýšení bazální lipolýzy v adipocytech a tím k uvolňování většího množství MK. Částečná inhibice enzymu hormon-senzitivní lipázy (HSL), který se účastní lipolýzy v tukové tkáni, může dokonce zlepšit inzulínovou senzitivitu a glukózový metabolismus (Girousse et al., 2013). Současně s lipolýzou může být dysregulováno i postprandiální ukládání lipidů přijatých z potravy díky nedostatečné aktivaci lipoproteinové lipázy (LPL) v tukové tkáni, která je závislá na inzulínu. Jednou z příčin zvýšené lipolýzy může být i hypertrofie adipocytů při obezitě,

se kterou se pojí dysregulace jejich sekreční funkce. Za fyziologických podmínek je lipolýza stimulována navázáním hormonů katecholaminů na β -adrenergní receptory adipocytů, čímž je spuštěna signalizační kaskáda aktivující HSL a také lipázu TAG v tukové tkáni (ATGL), což je proces spojený s fragmentací lipidových kapének (Morigny et al., 2016). Při obezitě je lipolytický účinek katecholaminů ve viscerálním tukovém depu ještě umocněn navýšením β -adrenergních receptorů a zvýšenou aktivitou sympatického nervového systému (Arner, 1999), v subkutánní tukové tkáni je však odpověď na katecholaminy naopak snížena (Reynisdottir et al., 1994). Naproti tomu antilipolytický účinek vykazuje inzulin vážící se na inzulinový receptor (Morigny et al., 2016). Jeho účinek je však při obezitě a IR potlačen narušením inzulinové signalizace.

U MK běžně dochází k substrátové kompetici s glukózou, kdy oxidace MK inhibuje oxidaci glukózy snížením aktivity glykolytických enzymů. Ve svalech a tukové tkáni je tak glukóza méně využívána a při zvýšených hladinách MK narůstají v cirkulaci i hladiny glukózy. Vzestup glykémie může být podpořen také glukoneogenezí, kde mohou volné MK a glycerol posloužit jako prekurzory (Perry et al., 2015). Glukoneogeneze v játrech může být stimulována i přímo, a to adipocytárním proteinem 2 (aP2/FABP4), který je uvolňován adipocyty do cirkulace při lipolytické aktivitě a současně podporuje rozvoj IR (Ertunc et al., 2015). Chronicky zvýšené hladiny volných MK v cirkulaci mohou mít řadu dalších negativních účinků. Jedním z nich je ektopické ukládání tuku mimo tukovou tkáň, které způsobuje lipotoxicitu v orgánech jako jsou játra, srdce, kosterní sval či pankreas. Důvodem je při nadměrné expanzi tukové tkáně omezení její skladovací kapacity z hlediska ukládání dalších energetických zásob. Lipotoxický efekt je způsoben nadměrným ukládáním lipidů a jejich intermediátů v buňkách, což má za následek narušení metabolických drah, rozvoj zánětu a inzulinové rezistence, ústící případně až v buněčnou smrt. Jednou z příčin buněčné smrti je např. nadměrná aktivace stresové odpovědi endoplazmatického retikula, které syntetizuje lipidy a fosfolipidy nebo reguluje homeostázu vápníku, důležité signální molekuly uplatňující se i při apoptóze (Han and Kaufman, 2016). Při stresu endoplazmatického retikula dochází mimo jiné k aktivaci transkripčního faktoru SREBP-1c nezávisle na inzulinu, což potom v jaterní tkáni vede ke zvýšení *de novo* lipogeneze a rozvoji steatózy (Ferre and Foufelle, 2010).

Nadměrný kalorický příjem může vést dále ke zvýšené produkci ROS, které kromě celkového poškození buněk a DNA vedoucího až k apoptóze. Mohou rovněž snižovat spotřebu kyslíku i β -oxidaci, a tím podporovat akumulaci lipidů (Medina-Gomez, 2012); (Wang et al., 2010). Většina orgánů s výjimkou tukové tkáně má jen omezenou schopnost

oxidovat MK a také je ukládat v podobě TAG do lipidových kapének. Při nedostatečném energetickém výdeji nemohou být všechny MK kompletně oxidovány, a tak vzniká řada hromadících se metabolitů MK včetně diacylglycerolů (DAG) či ceramidů, které působí toxicky na rozdíl od samotných TAG (Castro et al., 2014); (Yamaguchi et al., 2007). DAG aktivují nukleární faktor κ B (NF κ B) a atypické formy protein kinázy C (PKC), a to PKC θ v případě kosterního svalu a PKC ϵ v játrech, které přímo narušují inzulinovou signální kaskádu fosforylací substrátu inzulinového receptoru-1 [IRS-1; (Roden, 2004)]. Ceramidy pak inhibují další důležitý článek inzulinové signalizace, a to proteinkinázu B (Fox et al., 2007), mohou ale i podporovat zánět např. stimulací sekrece faktoru CCL2 v tukové tkáni, nebo aterosklerózu na základě stimulace plasminogen activator inhibitor-1 [PAI-1; (Yang et al., 2009)]. Na rozvoji zánětu a IR se podílejí i další serinové kinázy včetně c-Jun N-terminal kinase (JNK) a inhibitor of κ B kinase (IKK), které jsou aktivovány MK, ceramidy či TNF- α (Febbraio, 2014). V ektopickém ukládání lipidů hraje důležitou roli i apolipoprotein (Apo)-A5, jehož částečnou inhibicí je možné zlepšit celotělovou citlivost k inzulinu (Camporez et al., 2015).

V pankreatu za fyziologických podmínek dochází při zvýšené hladině MK ke stimulaci glukózou indukované sekrece inzulinu v β -buňkách pankreatu. Proces je zprostředkován receptorem volných MK (FFAR)-1, který je aktivován po navázání MK (Steneberg et al., 2005). Dlouhodobě zvýšené hladiny MK však u obézních jedinců inzulinovou sekreci narušují, a to např. zvýšenou produkcí ROS (Sharma and Alonso, 2014). Chronické působení MK pak působí lipotoxicky, způsobuje narušení signálních drah včetně procesu sekrece inzulinu a vede k celkovému selhávání β -buněk, což vede ke zvýšenému riziku rozvoje T2D (Sharma and Alonso, 2014); (Imamura et al., 2013). Oproti původním předpokladům ale není FFAR-1 do lipotoxického působení MK zapojen. Lipotoxicita se ve většině případů projevuje společně s působením vysokých hladin glukózy, takže se někdy mluví o tzv. glukolipotoxicitě (Mancini and Poynt, 2013); ta v β -buňkách pankreatu aktivuje transkripční faktory NF- κ B a signal transducer and activator of transcription (STAT)-1 pravděpodobně signální dráhou přes receptor tumor-nekrotizujícího faktoru (TNFR)-5 (Bagnati et al., 2016). Glukolipotoxickému působení na selhávání β -buněk mohou napomáhat i extracelulární prozánětlivé cytokiny, např. stimulací exprese 12-lipoxygenázy nebo NADPH oxigenázy-1 (Weaver et al., 2012).

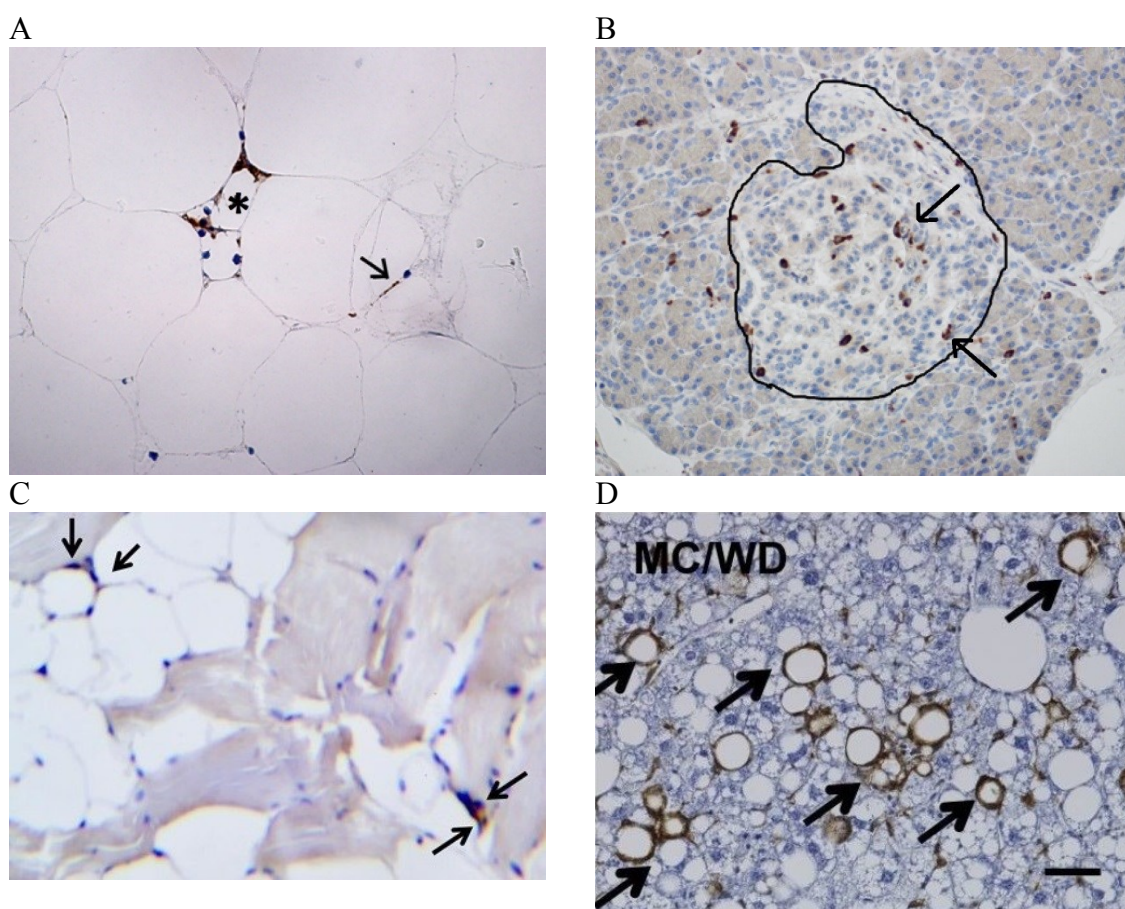
Také v jaterní tkáni může zvýšený přísun MK převýšit možnosti hepatocytů tyto MK oxidovat nebo sekretovat z jater ve formě VLDL částic, takže dochází k jejich akumulaci v jaterní tkáni. Hromaděním lipidů v játrech dochází k rozvoji steatózy, která může vyústit

v chronický zánět (steatohepatitidu), případně již nezvratnou cirhózu jater. U pacientů s jaterní steatózou jsou hlavním zdrojem jaterních TAG volné MK, překvapivě velká část však pochází z *de novo* lipogeneze (26 %), která je pravděpodobně aktivována na maximum, jelikož v postprandiální fázi už nedochází k jejímu dalšímu navýšení (Donnelly et al., 2005). Nárůst obsahu jaterních lipidů vede ke zvýšení syntézy cholesterolu a jeho akumulaci v játrech, čemuž napomáhá i navýšení počtu LDL receptorů stimulací exprese transkripčního faktoru SREBP-2 při hyperinzulinémii (van Rooyen et al., 2011). Nadbytek volného cholesterolu, který není esterifikován, působí v hepatocytech toxicky a může se podílet na rozvoji steatohepatitidy (Simonen et al., 2011). Jaterní, stejně jako adipocytární *de novo* lipogeneze je závislá na expresi transkripčního faktoru ChREBP, který je aktivován zvýšeným přísunem glukózy do buněk. V adipocytech je tak jeho exprese závislá na funkčnosti glukózového transportéru GLUT4, která je při IR potlačena. U obézních pacientů v subkutánní tukové tkáni klesá exprese isoformy ChREBP- β s větší aktivitou a celkově dochází k poklesu *de novo* lipogeneze a tím i ukládání lipidů. V hepatocytech je však situace opačná, exprese ChREBP- β i *de novo* lipogeneze se zvyšuje v důsledku vyššího přísunu glukózy (Eissing et al., 2013); (Kursawe et al., 2013). Míra jaterní *de novo* lipogeneze úzce souvisí s jaterní steatózou, zatímco IR a zánět pravděpodobně více korelují s expresí ChREBP v tukové tkáni, která může být snížena i v závislosti na obsahu tuků v dietě (Jois et al., 2016). Akumulace tuku v játrech způsobuje též snížení clearance inzulinu, která je převážně zprostředkována inzulinovým receptorem. MK tak společně s IR přispívají k rozvoji hyperinzulinémie (Castro et al., 2014).

2.5 Rozvoj chronického subklinického zánětu při obezitě

Zánět je za fyziologických podmínek běžnou a nezbytnou součástí správného fungování organismu. Podstatný je i pro zdravý nárůst a přestavbu tukové tkáně, čímž chrání organismus před lipotoxickým poškozením [viz výše a (Asterholm et al., 2014)]. V případě nadměrné akumulace tukové tkáně však dochází k rozvoji lokálního a hlavně chronického zánětu, který postupně přechází v zánět systémový. Jedná se o mírný zánět bez typických znaků akutního zánětu jako je zvýšená teplota nebo zarudnutí, dochází pouze ke zvýšení hladin prozánětlivých cytokinů TNF- α a interleukinu (IL)-6 nebo C-reaktivního proteinu (Petersen and Pedersen, 2005). V hypertrofované tukové tkáni je častější odumírání adipocytů spojeno s hypoxií a výlevem chemoatraktantů, což vede k vyšší infiltraci tukové

tkáně makrofágy a dalšími imunitními buňkami společně s produkcí prozánětlivých faktorů jako TNF- α nebo CCL2 (Sun et al., 2011). Makrofágy se v tukové tkáni akumulují, čemuž mohou napomáhat adipocyty-sekretované cytokiny TNF- α a IL-6 nebo nasycené MK jako palmitát, které u makrofágů stimulují expresi lamininu příbuzného proteinu Netrin-1 snižujícího migrační schopnosti makrofágů. U obézních pacientů se zvyšuje exprese netrinového receptoru Unc5b (Ramkhelawon et al., 2014). Na rozvoji zánětu v hypertrofované tukové tkáni u obezity se podílí i hyperinzulinémie stimulující infiltraci a proliferaci makrofágů a vyšší expresi cytokinů, která dále prohlubuje dysfunkčnost adipocytů (Pedersen et al., 2015).



Obrázek 1: Infiltrace makrofágů do tkání

Při rozvoji chronického zánětu dochází k infiltraci makrofágů (vyznačeny šipkami) do tukové tkáně (A), kde mohou tvořit typické crown-like structures (*), do pankreatických ostrůvků (vyznačen černou linií) (B), kosterního svalu (C) a jaterní tkáně (D).

Obrázky převzaty a upraveny dle publikací (Donath et al., 2013) (A, B), (Khan et al., 2015) (C) a (Itoh et al., 2013) (D).

K nárůstu počtu imunitních buněk dochází i v dalších tkáních postižených zánětem. U obézních pacientů s T2D byl pozorován nárůst makrofágů v pankreatu [Obrázek 1;

(Donath et al., 2013)]. V kosterním svalu se makrofágy a T-lymfocyty v největší míře hromadí kolem svalového tukového depa (Obrázek 1). Makrofágy ve svalu při obezitě sekretují chemotaktický cytokin CCL2 a kolem odumírajících svalových adipocytů mohou tvořit typické struktury, tzv. crown-like structures, podobně jako v tukové tkáni (Wu and Ballantyne, 2017). Stejně struktury se tvoří i kolem hepatocytů s velkými lipidovými kapénkami ve steatohepatitických játrech (Obrázek 1), kde jsou úzce spjaty s fibrózou (Itoh et al., 2013). Zánět dále při dlouhodobém působení prohlubuje IR, pravděpodobně ale nemá příliš velký vliv na počáteční rozvoj IR, jelikož se IR může vyvinout nezávisle na hladinách TNF- α a IL-6 nebo na intraabdominální obezitě (Petersen et al., 2007); (Lee et al., 2011).

TNF- α patří mezi nejznámější cytokiny účastníci se systémového zánětu. Uplatňuje se především v akutní fázi zánětu, nicméně má vliv i při mírném chronickém zánětu u obezity. TNF- α se váže na TNFR-1 receptor, což vede k aktivaci proteinu suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) nebo kináz JNK a IKK, a ve svém důsledku ke zhoršení citlivosti k inzulinu (Nguyen et al., 2005). TNF- α může zvyšovat IR v důsledku stimulace lipolýzy v adipocytech díky aktivaci HSL a naopak inhibici LPL. Tím dochází ke zvýšenému vyplavování MK z tukové tkáně a potenciaci ektopického ukládání MK s následnou tvorbou DAG a lipotoxickým účinkem (Plomgaard et al., 2008); (Pedersen et al., 2015). Signalizace TNF- α může též iniciovat buněčnou smrt, která spolu s působením dalších prozánětlivých faktorů souvisí mimo jiné se sarkopenií.

Při obezitě a rozvoji chronického zánětu dochází ke zvýšení hladin i dalších cytokinů v cirkulaci, například IL-6 produkovaného makrofágy či adipocyty (Carey et al., 2004). IL-6 je však poměrně kontroverzní molekulou. Kromě prozánětlivého účinku může podněcovat i IR, za fyziologických podmínek ale může vykazovat i protizánětlivé působení. V kosterním svalu je pak IL-6 sekretován v odpovědi na cvičení, a to bez známky svalového poškození (Fischer, 2006). V kulturách myocytů může dráhou přes STAT-3 aktivovat i AMPK, stimulovat expresi glykogen syntázy, GLUT4 či PPAR α podporujících tvorbu glykogenu a oxidaci lipidů, a celkově zlepšovat inzulinovou senzitivitu (Al-Khalili et al., 2006); (Carey et al., 2006). Inhibice IL-6 spolu s dalšími interleukiny účastnících se udržování metabolické rovnováhy pak může mít naopak nežádoucí účinky včetně navýšení tělesné hmotnosti, rozvoje IR či systémového zánětu (Febbraio, 2014). Dle Pedersen a Febbraio by při svalové nečinnosti mohlo docházet k rozvoji rezistence k IL-6, což by vedlo ke zvýšení hladin IL-6 v cirkulaci současně s rozvojem IR (Pedersen and Febbraio, 2012).

Rozvoje T2D, dysfunkce a buněčné smrti pankreatických β -buněk se ve velké míře účastní IL-1 β exprimovaný makrofágy, dendritickými buňkami či samotnými β -buněkami, a to v odpovědi na aktivaci toll-like receptorů (TLR). K produkci IL-1 β nejen v pankreatu je rovněž zapotřebí aktivace inflamasomu nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor with pyrin N-terminal domain 3 (NLRP3) v imunitních buňkách, ke které dochází např. působením ceramidů, nasycených MK či oligomerů amyloidního peptidu islet amyloid polypeptide (IAPP) produkovaného pankreatickými β -buněkami společně s inzulinem (Febbraio, 2014), (Sharma and Alonso, 2014).

Se systémovým zánětem může souviset i složení střevní mikroflóry a zvýšení prostupnosti střevní stěny pro bakteriální endotoxiny, které stimulují prozánětlivou odpověď přes TLR receptory (Miele et al., 2015). TLR receptory mohou být aktivovány i endogenními molekulami při tzv. sterilním zánětu za nepřítomnosti patogenů. Působí tak např. nasycené MK stimulující receptor TLR-4, který stimuluje signalizační kaskádu IKK a NF κ B (Rocha et al., 2016).

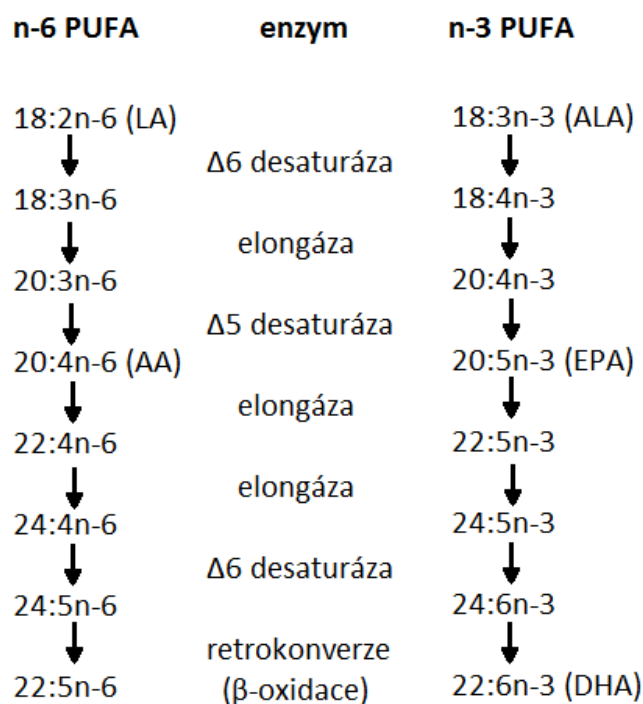
2.6 Léčba obezity

Prevalence obezity ve světě se neustále zvyšuje, v roce 2014 bylo obézních již 600 milionů lidí. Obezita je proto považována za celosvětovou epidemii, přičemž prevalence přidružených onemocnění oběhové soustavy a T2D vykazují stejné trendy. Například v roce 2015 byla v ČR téměř čtvrtina dospělých pacientů registrovaných u praktických lékařů sledována pro hypertenzi, s T2D se léčilo 787 tisíc osob (Kolektiv, 2016). Nejúčinnějším prostředkem proti obezitě zatím nadále zůstává odstranění jejích příčin, tedy zlepšení životního stylu, a to jak navýšením pohybové aktivity, tak změnou jídelníčku ve smyslu zdravého stravování s přiměřeným energetickým příjmem. Účelem léčby obezity však není pouze odstranit přebytečnou tukovou tkáň, ale především zamezit dalšímu rozvoji nebo zmírnit působení rizikových faktorů metabolického syndromu. Jak již bylo uvedeno výše, obézní pacienti s metabolickým syndromem mají zvýšené riziko vzniku T2D a kardiovaskulárních onemocnění (Parikh and Mohan, 2012). V tomto směru hraje velkou roli nejen energetická hodnota přijímané stravy, ale také její složení, které může pozitivně nebo i negativně ovlivnit rozvoj výše uvedených rizikových faktorů, případně i účinky farmakologické léčby.

2.7 Vliv složení stravy a typu lipidů na metabolismus, n-3 PUFA

Obezita je ve většině případů spojena s nadměrným příjmem energie, a to nejčastěji v podobě jídel s vysokým obsahem tuků a sacharidů s vysokým glykemickým indexem. Taková strava je často označována jako tzv. „západní dieta“ (western diet). V případě sacharidů se často jedná o jednoduché sacharidy jako je glukóza, fruktóza a sacharóza, u tuků pak může docházet k nadměrnému příjmu nasycených MK a n-6 PUFA a naopak sníženému příjmu n-3 PUFA. Vliv složení potravy společně se složením střevní mikroflóry je v posledních letech velmi studovanou oblastí zájmu. Změny ve složení střevní mikroflóry mohou mít značný vliv na lidské zdraví, přičemž její složení je závislé na řadě faktorů, včetně skladby přijímané diety. V experimentálních podmínkách může podávání vysokotukové diety u myši narušit permeabilitu střevní stěny, čímž se zvýší prostupnost pro bakteriální endotoxiny (Miele et al., 2015), které následně ovlivňují imunitní systém. Mezi endotoxiny patří například lipopolysacharidy, které se váží na TLR4 receptor a tak stimulují prozánětlivou odpověď. Transplantací střevní mikroflóry ze zdravého dárce nebo podáním vhodného bakteriálního kmenu lze v experimentu na hlodavcích docílit poklesu hmotnosti, zlepšení systémového zánětu i citlivosti organismu k inzulinu. Naopak transplantace střevní mikroflóry z myši krmených vysokotukovou dietou axenickým jedincům (tzv. „germ-free“) vedla k nárůstu hmotnosti a rozvoji inzulinové rezistence i v případě, kdy tyto axenické myši byly krmené kontrolní nízkotukovou dietou (Miele et al., 2015), (Chen et al., 2014).

Tuky se v potravě vyskytují převážně v podobě nasycených či nenasycených MK, kde nasycené obsahují MK s jednoduchými vazbami v uhlíkovém řetězci, kdežto nenasycené MK mají alespoň jednu dvojnou vazbu. MK s více dvojnými vazbami se řadí mezi PUFA a rozdělují se podle pozice dvojných vazby od methylového konce řetězce. Z výživového hlediska jsou významné n-3 a n-6 PUFA s dvojnou vazbou na třetím, resp. šestém uhlíku od konce uhlíkového řetězce, jejichž poměr bývá při obezitě často výrazně vychýlen ve prospěch n-6 PUFA. Hladiny n-3 a n-6 PUFA a jejich metabolitů ve tkáních odpovídají jejich obsahu v dietě, jelikož člověk není schopen konverze mezi n-3 a n-6 řadami, ani jejich syntézy *de novo*. Ve stravě tak musí přijímat alespoň základní PUFA, kyseliny α -linolenovou (ALA; 18:3n-3) a linolovou (18:2n-6), které mohou sloužit jako prekurzory pro syntézu dalších PUFA (Obrázek 2).



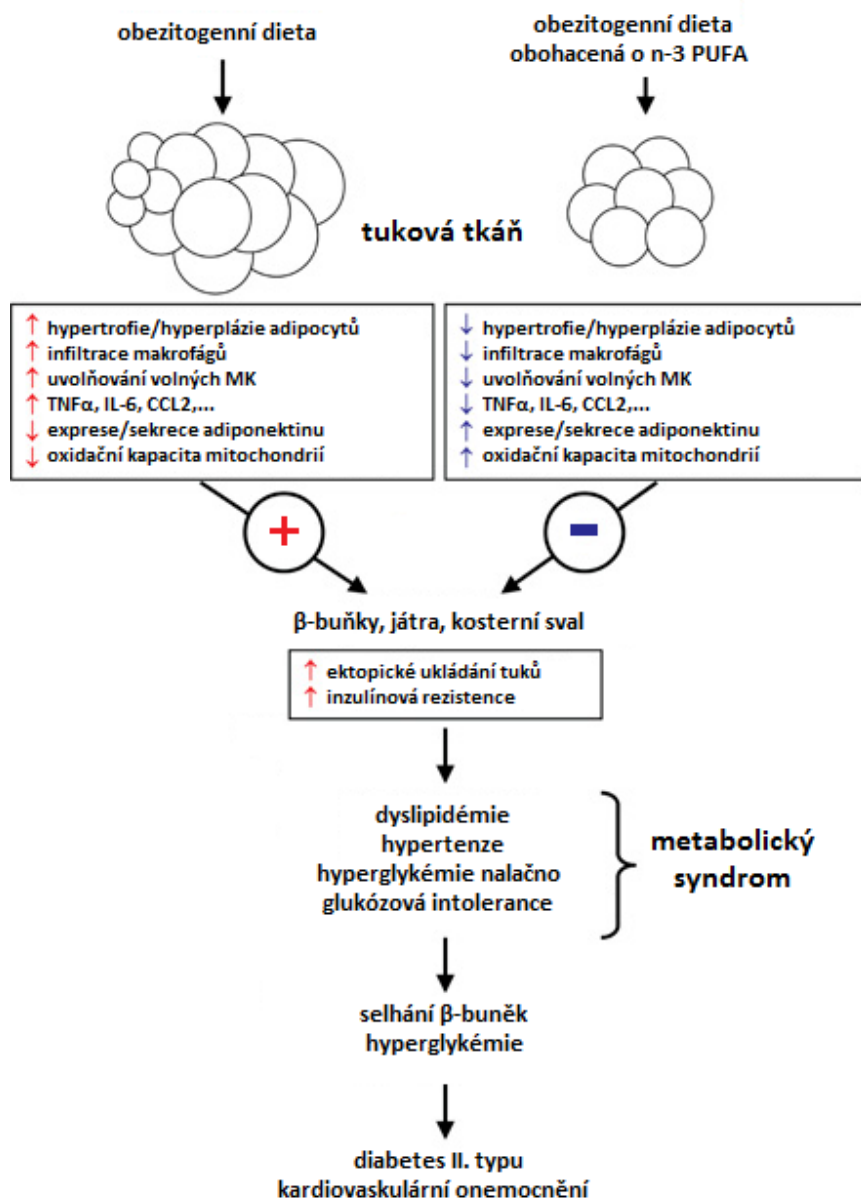
Obrázek 2: Konverze PUFA v živočišných buňkách

AA – kyselina arachidonová, ALA – kyselina α-linolenová, EPA – kyselina eikosapentaenová, DHA – kyselina dokosaheptaenová, LA – kyselina linolová

Lipidové mediátory syntetizované z PUFA vázaných v membránových fosfolipidech se pak řadí k velmi potentním signálním molekulám náležícím ke skupině prostaglandinů, tromboxanů, leukotrienů a lipoxinů, přičemž výhradně z n-3 PUFA vznikají resolvin, protektiny a maresiny, které se pak společně s lipoxiny uplatňují při zmírnění a ukončení zánětu (Buckley et al., 2014). Lipidové mediátory odvozené z n-6 PUFA (především z arachidonové kyseliny; 20:4n-6) mají převážně prozánětlivé účinky, a vzhledem ke konkurenci mezi n-3 a n-6 PUFA o enzymy zapojené v syntéze jejich metabolitů je proto důležitý poměr n-3 a n-6 PUFA v dietě. V západní dietě poměr n-6 : n-3 běžně přesahuje 10:1, zatímco doporučován je poměr 5:1 a nižší, v některých případech až 1:1 (Simopoulos, 2002). Vysoký příjem nasycených MK je spojován se stimulací prozánětlivé odpovědi aktivací TLR4 receptoru (viz výše), tvorbou prozánětlivých lipopolysacharidů střevní mikroflórou či produkcí LDL a navyšováním hladin oxidovaných LDL s aterogenním a prozánětlivým účinkem (Rocha et al., 2016). Vyšší obsah nasycených MK a n-6 PUFA ve stravě byl zjištěn například u pacientů s jaterní steatózou (de Castro and Calder, 2017), a také výživa bohatá na n-6 PUFA může být spojována se zánětlivými onemocněními jako je ateroskleróza, revmatoidní artritida nebo astma (Simopoulos, 2002). Obecně PUFA působí rovněž jako ligandy transkripčních faktorů PPAR (viz výše), čímž ovlivňují řadu buněčných procesů včetně proliferace a energetického metabolismu buňky. Na proliferaci

adipocytů (adipogenezi) se podílí především n-6 PUFA v čele s arachidonovou kyselinou, která přispívá k expanzi tukové tkáně a celkově zvyšuje riziko obezity (Massiera et al., 2003); (Simopoulos, 2016).

n-3 PUFA jsou MK s dlouhým řetězcem, které jsou hojně studovány a diskutovány pro své benefiční účinky (Obrázek 3). Mezi nejznámější n-3 PUFA řadíme kyseliny ALA, EPA a DHA. ALA může sloužit jako prekurzor pro syntézu EPA a DHA (Obrázek 2), ale u člověka je efektivita konverze zanedbatelná, a to jak v případě podávání ALA, tak i EPA, která je vlastně intermediátem při syntéze DHA z ALA (Arterburn et al., 2006). Důležitý je tak dostatečný příjem EPA a DHA již ve stravě, a to rovněž proto, že většinou vykazují silnější účinky na metabolismus než ALA (Flachs et al., 2009). ALA běžně přijímáme z rostlinných zdrojů, vyskytuje se např. ve vlašských ořeších a především v řadě rostlinných olejů a semínkách, jako jsou například lněná, chia či konopná. Zdrojem EPA a DHA jsou hlavně tučné mořské ryby, korýši a další mořské plody, nejhojněji se však vyskytují v mořském fytoplanktonu, který tvoří základ potravního řetězce v mořích a oceánech. Mezi nejvýznamnější metabolické účinky zvýšeného příjmu n-3 PUFA ve stravě patří redukce hladin TAG v plasmě, kdy může stimulovat LPL a celkově snižovat hypertriacylglycerolemii (Backes et al., 2016). n-3 PUFA mohou rovněž při dlouhodobém užívání stabilizovat aterosklerotické plaky, čímž snižují riziko infarktu (Thies et al., 2003), a též působí protizánětlivě. Potlačují aktivitu cyklooxygenázy-2, NFκB či expresi TNF-α (Massaro et al., 2006); (Shi et al., 2006), dále inhibují signalizaci TLR-4 pravděpodobně asociací s β-arrestinem-2 a zároveň narušují lokalizaci TLR-4 do lipidových raftů, což zabraňuje jeho aktivaci (Rocha et al., 2016). Protizánětlivé působení n-3 PUFA je pravděpodobně též výsledkem stimulace receptoru FFAR-4 (Nobili et al., 2014) nebo prostřednictvím i jiné na FFAR-4 nezávislé signalizace, která dosud nebyla objasněna (Paerregaard et al., 2016). n-3 PUFA stimulují β-oxidaci MK na úkor jejich syntézy a ukládání. Jsou schopné regulovat transkripční faktory PPAR, SREBP a ChREBP účastníci se lipidového i glukózového metabolismu. Podávání EPA a DHA tak může např. snížit *de novo* lipogenezi v hepatocytech potlačením aktivity SREBP-1c (Howell et al., 2009) či narušením jaderné translokace ChREBP, který se podílí na regulaci exprese enzymů syntázy mastných kyselin (FAS) a jaderní pyruvát kinázy, tj. klíčových enzymů lipogeneze, respektive glykolýzy (Dentin et al., 2005).



Obrázek 3: Protektivní účinky n-3 PUFA

Přepřacováno dle (Flachs et al., 2009).

Podle nejnovějších doporučení American Heart Association je vhodné používat n-3 PUFA suplementaci u pacientů s hypertriacylglycerolémií, ischemickou chorobu srdeční (včetně infarktu myokardu), a pravděpodobně i pro pacienty se srdečním selháním, a to především pro bezpečnost terapie, kdy se při podávání neprojevují žádné závažnější vedlejší účinky (Siscovick et al., 2017). n-3 PUFA rovněž snižují klidovou tepovou frekvenci, krevní tlak a zlepšují srdeční arytmií (Mozaffarian and Wu, 2011), pravděpodobně by tak mohly být účinné obecně v prevenci kardiovaskulárních onemocnění, nebo i IR (Piscitelli et al., 2011). V řadě studií se však výsledky neshodují, nejsou dostatečně konzistentní a přesvědčivé, jako v případě vlivu n-3 PUFA na T2D a kardiovaskulární

onemocnění v již pokročilém stadiu (Jeppesen et al., 2013). Může to být způsobeno řadou faktorů, např. délkou intervence, současnou léčbou statiny u pacientů s T2D, či formou, ve které jsou n-3 PUFA podávány. Nejvyšší účinnost totiž patrně vykazují EPA a DHA podávané ve formě fosfolipidů (Rossmeisl et al., 2012); (Ramprasath et al., 2015), zatímco v mnoha studiích jsou častěji používány n-3 PUFA vázané v ethylesterech či TAG s možnou nižší biologickou dostupností (Jeppesen et al., 2013); (Schuchardt et al., 2011). Poměrně málo prozkoumanou, avšak dle dosavadních výsledků poměrně účinnou formou jsou EPA a DHA vázané v esterech vosků, které se vyskytují v oleji ze zooplanktonních korýšů *Calanus finmarchicus* (Obrázek 4). Při podávání této formy n-3 PUFA nebyly pozorovány žádné závažné vedlejší účinky (Tande et al., 2016) a dle Cook *et al.* vykazuje tato forma u lidí i vyšší biologickou dostupnost EPA a DHA než pokud jsou tyto n-3 PUFA vázané v ethylesterech, které se v potravních doplncích vyskytují častěji (Cook et al., 2016). U myších modelů krmených vysokotukovou dietou pak byla prokázána řada benefičních účinků, včetně snížení přírůstku hmotnosti a tělesného tuku, zlepšení glukózové tolerance, potlačení zánětu v tukové tkáni či rozvoje hypertenze indukované podáváním angiotenzinu II, a to i při nižší koncentraci EPA a DHA než se běžně používá v obdobných studiích (Hoper et al., 2013); (Salma et al., 2016).



Obrázek 4: *Calanus finmarchicus*
(Foto: Sindre A. Pedersen, NTNU)

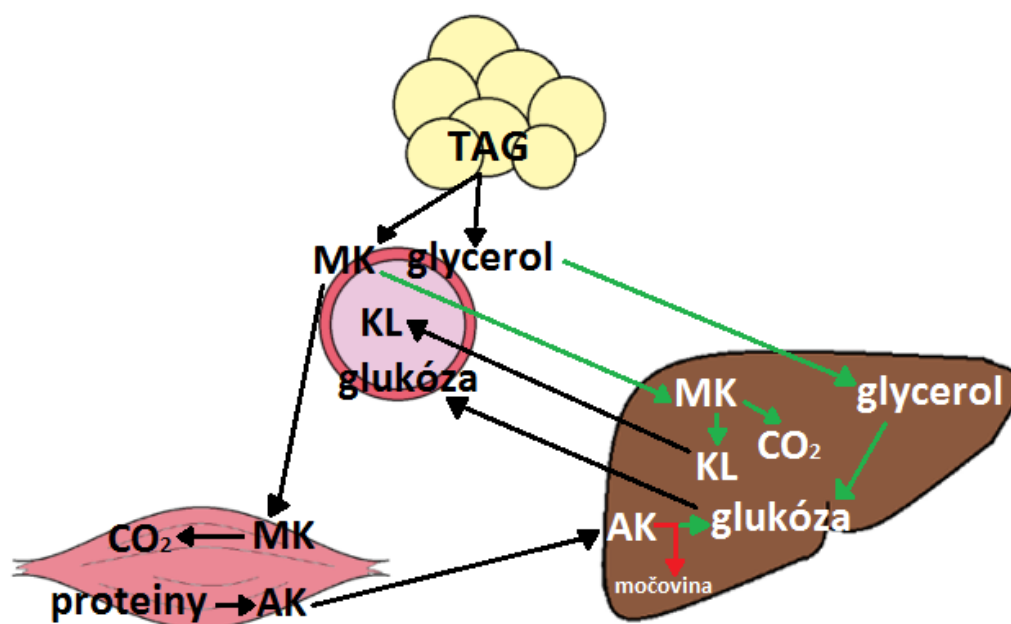
2.8 PPAR α

PPAR jsou transkripční faktory ovlivňující expresi řady genů účastnících se buněčné proliferace a diferenciace, zánětu či energetického metabolismu (Feige et al., 2006). Podobně jako jiné jaderné receptory obsahují N-koncovou doménu aktivující transkripci, DNA vazebnou doménu s motivem zinkového prstu a hydrofobní vazebnou doménu pro lipofilní ligandy. PPAR tvoří heterodimery s retinoidním X receptorem, se kterým se v jádře dohromady váží na DNA v oblasti promotoru příslušných genů. U některých genů tak dochází k aktivaci jejich transkripce, u jiných je naopak inhibována. Převážně k inhibici genové exprese může docházet i protein-proteinovými interakcemi s dalšími transkripčními faktory. Celkově je pak vliv PPAR považován převážně za pozitivní. PPAR se vyskytují ve třech izoformách, a to jako PPAR α , PPAR β/δ a PPAR γ . Mají odlišnou tkáňovou distribuci, mírně odlišná vazebná místa pro ligandy i jinou skupinu cílových genů (Pawlak et al., 2015). PPAR ligandy mohou být jak látky endogenní, tak látky syntetické jako takzvané peroxisomální proliferátory, mezi které patří herbicidy, insekticidy, ftaláty, nebo fibráty a thiazolidindiony užívané v medicíně při léčbě T2D pro svůj hypolipidemický účinek a zvyšování citlivosti k inzulínu. Z endogenních látek jsou hlavními ligandy PUFA včetně EPA a DHA (Deckelbaum et al., 2006), dále se mohou vázat i metabolity PUFA včetně eikosanoidů a endokanabinoidů či meziproductů katabolismu MK, lipolýzy a lipogeneze (Kersten, 2014). Mezi ligandy mohou patřit i fosfolipidy jako např. 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycerol-3-fosfatidylcholin, nicméně jejich role v aktivaci PPAR α není stále zcela objasněna (Chakravarthy et al., 2009). Mezidruhově se může afinita ligandů k PPAR α lišit, což bylo dokázáno na řadě syntetických agonistů u myších a lidských receptorů (Willson et al., 2000).

PPAR α je jedním z klíčových regulačních faktorů lipidového metabolismu, hojněji se tak vyskytuje v tkáních s vyšší mírou oxidace MK, především v játrech, BAT, dále i v srdci nebo ledvinách. PPAR α je aktivován především při nedostatku energie v důsledku hladovění (Obrázek 5) a ovlivňuje expresi až stovek cílových genů. Usnadňuje vstřebávání MK z cirkulace a jejich katabolismus prostřednictvím exprese genů regulujících transport, vazbu, aktivaci a β -oxidaci MK. Ovlivňuje také tvorbu ketoláték, glukoneogenezi, metabolismus aminokyselin i tvorbu a sekreci žluče. Většina dosavadních studií se věnovala úloze PPAR α v játrech, ale i v dalších tkáních jako je srdce či tenké střevo, kde má pravděpodobně podobnou úlohu v regulaci metabolické homeostázy (Kersten, 2014). Zvýšenému vstřebávání MK napomáhá stimulací genové exprese LPL a současně

potlačením produkce jaterního apolipoproteinu Apo-C3, který je součástí VLDL částic a inhibuje LPL aktivitu (Pawlak et al., 2015). PPAR α reguluje expresi většiny jaterních genů responsivních k PUFA, přičemž MK s delším řetězcem a vyšším počtem dvojných vazeb jsou v řadě případů účinnější. V rámci n-3 PUFA jsou pak nejúčinnější DHA a ALA (Sanderson et al., 2008). Některé experimenty také naznačují, že aktivita PPAR α není přímo regulována hladinami volných MK v plasmě (Sanderson et al., 2009), případně je regulována pouze MK přijatými v dietě, ale nikoliv MK vzniklými lipolýzou v adipocytech (Chakravarthy et al., 2005). Funkce PPAR α však může být na základě *in vitro* studií kromě navázání ligandu ovlivněna i posttranslačními modifikacemi včetně fosforylace či sumoylace. Ve stavu sytosti by se mohlo jednat o kinázy PKC a mitogeny aktivovanou protein kinázu, které jsou aktivovány inzulinem, respektive glukózou, a které se účastní řízení energetického metabolismu buňky. Pomocí PPAR α tak může být v játrech stimulována i lipogeneze a ukládání MK. Inzulinem je však rovněž aktivován proteinový komplex mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1), který aktivitu PPAR α tlumí. Při hladovění je aktivována cAMP-dependentní protein kináza A, která fosforylací PPAR α v myších hepatocytech stimuluje β -oxidaci MK, čímž může dojít k navýšení ketogeneze a glukoneogeneze (Pawlak et al., 2015). Aktivita PPAR α tak může být regulována podle stavu sytosti a energetických potřeb organismu. Exprese PPAR α je rovněž závislá na cirkadiánním rytmu (Lemberger et al., 1996).

Podávání syntetických agonistů PPAR α u myši by patrně mohlo vést k potlačení prozánětlivé signalizace interleukinů IL-6 a IL-1 β v akutní fázi zánětu. V *in vitro* pokusech Mansouri *et al.* demonstrovali snížení exprese genů prozánětlivé odpovědi závislých na IL-6 a IL-1 β , u myši se specifickou expresí PPAR α pouze v játrech prokázali pokles cytokinů TNF- α , IL-6 a IL-1 β v cirkulaci, v aortě pak snížení exprese adhezivních molekul uplatňujících se při rozvoji aterosklerózy (Mansouri et al., 2008). U těchto experimentů není ale jasné, zda se jednalo o účinek zprostředkovaný přímo PPAR α , působením agonistů nezávisle na PPAR α , nebo pouze zvýšením metabolismu MK (Gervois and Mansouri, 2012). Naproti tomu chronický zánět by mohl negativně ovlivňovat PPAR α signalizaci a tím dysregulovat lipidový metabolismus, jak naznačili Stienstra *et al.* podáváním IL-1 β myším či jeho aplikací na hepatocytární kultury, kdy IL-1 β snižovalo aktivitu i expresi PPAR α (Stienstra et al., 2010).



Obrázek 5: Funkce PPARα při hladovění

Při hladovění dochází v tukové tkáni k indukci lipolýzy a uvolnění MK a glycerolu do oběhu. MK jsou v játrech kompletně oxidovány nebo jsou z nich vytvořeny ketolátky, které jsou uvolňovány do cirkulace. Z glycerolu je v procesu glukoneogeneze tvořena glukóza. Z aminokyselin pocházejících ze štěpení proteinů kosterního svalu je rovněž syntetizována glukóza, naopak je potlačena jejich degradace a vstup do močovinného cyklu. Procesy stimulované PPARα jsou vyznačeny zelenými šipkami, potlačované procesy červenými šipkami.

AK – aminokyseliny, KL – ketolátky, MK – mastné kyseliny, TAG - triacylglycerol

Obrázek přepracován dle (Kersten, 2014).

2.9 Myší modely založené na PPARα

Transkripční faktor PPARα byl objeven na základě zkoumání peroxisomálních proliferátorů, tj. látek s hypolipidemickým účinkem, které u hlodavců zvyšují množství peroxisomů, v játrech ale mohou současně působit též jako hepatokarcinogeny (Isseman and Green, 1990). Klíčová role PPARα v lipidovém metabolismu byla odhalena především za použití myších modelů s delecí genu pro PPARα, tj. PPARα knockout (KO) myši (Kersten, 2014). Poprvé byly PPARα-KO myši připraveny delecí části PPARα genu vložením příslušného plazmidového vektoru do embryonálních kmenových buněk pomocí elektroporace. Transfekované kmenové buňky byly injikovány do blastocyst, které byly vloženy do náhradních matek a ze vzniklých chimerických zvířat pak byly křížením získány myši bez exprese PPARα (Lee et al., 1995). Pomocí tohoto modelu pak bylo potvrzeno působení peroxisomálních proliferátorů právě prostřednictvím transkripčního faktoru

PPAR α (Lee et al., 1995). PPAR α -KO myši byly využity i k přípravě dalších modelů exprese PPAR α , např. myši se specifickou expresí PPAR α v játrech. Příslušného fenotypu bylo u myši docíleno metodou hydroporace, injekcí vektoru s expresí PPAR α do cirkulace. Exprese PPAR α byla následně detekována pouze v játrech, změna v genové expresi však není trvalá (Mansouri et al., 2008). Finck *et al.* vytvořili transgenní myši se zvýšenou expresí PPAR α v srdci použitím komplementárního DNA konstruktů. Vysoká exprese PPAR α v kardiomyocytech stimulovala rozvoj fenotypu vyskytujícího se u diabetických pacientů, došlo k poklesu vstřebávání a oxidace glukózy a naopak ke zvýšení oxidace MK a akumulaci TAG (Finck et al., 2002). Naopak delece PPAR α v srdci tlumí β -oxidaci, což je doprovázeno oxidací glukózy a glykolýzou (Campbell et al., 2002). Nadměrnou expresí PPAR α je možné indukovat i u buněčných kultur. V transfekovaných myších pankreatických β -buňkách bylo možné při zvýšené expresi PPAR α pozorovat zachování inzulínové sekrece i po přidání palmitátu běžně narušujícího glukózou-indukovanou sekreci inzulínu (Hogh et al., 2013).

U myši s absencí PPAR α dochází při hladovění či podávání vysokotukové diety ke značnému hromadění lipidů v játrech (Kersten et al., 1999) a v srdci (Leone et al., 1999), což je pravděpodobně způsobeno nedostatečnou β -oxidací MK a zároveň pokračující syntézou TAG, která patrně není pod významným vlivem PPAR α . Hladovění vede u PPAR α -KO myši ke zvýšení hladin volných MK v plasmě a v játrech naopak ke snížení produkce karnitinů sloužících k transportu MK skrz mitochondriální membránu, s čímž souvisí narušená β -oxidace MK (Makowski et al., 2009). Současně u těchto myši dochází mimo jiné k rozvoji závažné hypoglykémie, zvýšenému katabolismu aminokyselin, nedostatečné funkci citrátového cyklu a snížené produkci ketolátů (Leone et al., 1999); (Makowski et al., 2009). Naproti tomu ke zvýšení hladin TAG dochází zatím z neznámých důvodů pouze v postprandiálním stavu, ale při hladovění nikoliv (Hashimoto et al., 2000).

Dalším důležitým milníkem ve výzkumu funkce PPAR α bylo zavedení myšího modelu s expresí humánního PPAR α (hPPAR α). Z počátku se jednalo o myši na genetickém pozadí PPAR α -KO s expresí hPPAR α omezenou pouze na játra, která byla regulována tetracyklinem (Cheung et al., 2004). V roce 2008 pak Yang *et al.* ve své práci popsali nový myší model se stabilní celotělovou expresí hPPAR α na PPAR α -KO genetickém pozadí (Yang et al., 2008). Kompletní lidský gen pro PPAR α včetně regulačních sekvencí byl vložen do oplozených myších vajíček pomocí arteficiálního chromozomu bakteriofágu P1 a takto připravení transgenní jedinci byli dále kříženi s myšmi PPAR α -KO kmene 129S1/SvImJ, aby u nich byla zajištěna exprese pouze lidského PPAR α (Yang et al., 2008). Myší kmen 129S1/SvImJ představoval běžně používaný kmen pro tvorbu transgenních

myších linií, a to především díky celé řadě zavedených buněčných linií embryonálních kmenových buněk. Transgenní myši hPPAR α byly vyvinuty především za účelem výzkumu mezidruhových odlišností v toxickém působení chemických látek včetně peroxisomálních proliferátorů, pro které nebyl dostupný žádný člověku blízký model. Použity byly například ve studiích týmů Patterson *et al.* či Albrecht *et al.* (Patterson et al., 2012); (Albrecht et al., 2013). Myši hPPAR α jsou charakteristické zachováním exprese hPPAR α v orgánech s vysokým katabolismem MK, jako jsou játra, BAT či srdce, přičemž úroveň exprese hPPAR α v játrech byla obdobná jako u kontrolních jedinců a byla rovněž stimulována hladověním. Regulace genové exprese PPAR α by tak u transgenních i kontrolních myší měla být obdobná, rozhodně však není totožná z důvodu pouze 94% homologie PPAR α vazebné domény pro ligandy (Yang et al., 2008).

2.10 Odlišnosti myšího a humánního PPAR α

Rozdíly ve vlivu peroxisomálních proliferátorů u lidí a hlodavců z hlediska zvýšeného rizika rozvoje karcinomu jater byly pozorovány již před objevením samotných receptorů PPAR. Pomocí PPAR α -KO myší pak bylo potvrzeno, že peroxisomální proliferátory působí právě prostřednictvím PPAR α (Lee et al., 1995). U lidí však podávání PPAR α agonistů nevyvolává ani zvýšenou proliferaci peroxisomů či hepatocytů, ani zvýšené riziko vzniku hepatokarcinomu [shrnutí v (Peters et al., 2005)], a za příčinu těchto odlišných reakcí tak začal být považován samotný PPAR α (Cattley et al., 1998). Dle dosavadních poznatků je regulace lipidového metabolismu pomocí PPAR α u lidí a myší v podstatě totožná, současně je obdobně velká i míra exprese PPAR α v myších i lidských hepatocytech (Rakhshandehroo et al., 2009). Přesto můžeme nalézt řadu genů, které jsou při stimulaci PPAR α exprimovány odlišně. Podávání agonisty PPAR α specificky regulovalo geny zapojené v drahách glukoneogeneze a glykolýzy pouze u myších hepatocytů, zatímco výhradně u lidských hepatocytů došlo ke stimulaci exprese genů týkajících se metabolismu xenobiotik a syntézy apolipoproteinů (Rakhshandehroo et al., 2009). Jedním z genů syntézy apolipoproteinů by mohl být i Apo-A5, který má vliv na ektopické ukládání tuků a IR (Prieur et al., 2009); (Camporez et al., 2015). Podle nepublikovaných dat ze skupiny Dr. Kerstena by však mělo u myších hepatocytů po podání PPAR α agonisty ke stimulaci exprese Apo-A5 docházet [zmíněno v (Kersten, 2014)]. Vzhledem ke 100% homologii v DNA vazebné doméně lidského a myšího PPAR α (Yang et al., 2008) může být odlišná

stimulace některých genů u myši a lidí pravděpodobně způsobena přítomností či naopak nepřítomností funkční DNA sekvence PPAR α responzivního elementu v příslušném genu fungující jako vazebné místo pro PPAR α . V experimentech srovnávajících odlišnosti mezi myšími modely s expresí myšího a humánního PPAR α byla prokázána snížená schopnost regenerace jaterní tkáně po parciální hepatektomii u transgenních jedinců (Liu et al., 2015), což nejspíš souvisí s nedetekovanou aktivací proliferace hepatocytů u hPPAR α myši po podání PPAR α agonisty (Yang et al., 2008). U hPPAR α myši pak nedocházelo k aktivaci exprese onkogenu *c-myc* a některých genů kódujících povrchové proteiny buněčné membrány jako antigeny cluster of differentiation (CD)-39 a CD-63 (Yang et al., 2008).

3. Cíle diplomové práce

Tato diplomová práce byla vypracována na oddělení Biologie tukové tkáně Fyziologického ústavu AV ČR, v.v.i.. Toto oddělení se dlouhodobě zabývá výzkumem benefičních účinků n-3 PUFA v prevenci a léčbě obezity, IR a dalších metabolických poruch spojených s obezitou. Účinky n-3 PUFA jsou studovány na různých modelech laboratorních myší, u kterých je obezita indukována dietou s vysokým obsahem tuků.

Je známo, že účinnost n-3 PUFA je závislá na lipidové formě, ve které jsou n-3 PUFA podávány v dietě [např. (Rossmeisl et al., 2012); (Ramprasath et al., 2015)]. Jako poměrně účinné se jeví prozatím málo zkoumané n-3 PUFA vázané ve formě esterů vosku (wax esters), které se hojně vyskytují v oleji ze zooplanktonu *Calanus finmarchicus* (ω 3Cal).

Předchozí studie naznačily, že transkripční faktor PPAR α je klíčovou molekulou lipidového metabolismu, který reguluje především katabolismus MK. Je známo, že regulace genové exprese prostřednictvím PPAR α se může lišit v závislosti na tom, zda se jedná o lidskou nebo hlodavčí formu tohoto faktoru. Například po aktivaci PPAR α působením různých agonistů dochází u hlodavců k proliferaci peroxisomů spojené se zvýšeným rizikem rozvoje hepatokarcinomu, zatímco u lidí tento jev nebyl pozorován. Výše uvedené poznatky jsou důležité i z toho důvodu, že n-3 PUFA mohou fungovat jako agonisté PPAR α (Deckelbaum et al., 2006). V rámci studia možného odlišného mezidruhového působení n-3 PUFA prostřednictvím PPAR α byl proto studován transgenní myší model s celotělovou expresí výlučně humánní formy PPAR α [hPPAR α ; viz reference (Yang et al., 2008)], kterému byly podávány n-3 PUFA ve formě ω 3Cal. Dále byly pro studium účinků ω 3Cal využity i transgenní myši s úplnou absencí PPAR α (PPAR α -KO).

Specifické cíle práce byly:

- založení a expanze kolonie transgenních myší s expresí humánní formy PPAR α stejně jako myší s absencí PPAR α ;
- zavedení genotypizačního protokolu pro myší a humánní formu PPAR α ;
- studium rozvoje obezity a asociovaných metabolických poruch, které byly indukovány dlouhodobým podáváním vysokotukové diety u kontrolních myší a dále hPPAR α a PPAR α -KO myší;
- analýza účinků dietní intervence pomocí n-3 PUFA ve formě oleje z *Calanus finmarchicus* na rozvoj obezity a metabolických poruch u výše zmíněných myších modelů.

4. Metody

4.1 Materiál

4.1.1 Chemikálie

10x PCR pufr.....	Roche, Německo
agaróza.....	Serva, Německo
diethylether.....	Penta, ČR
DNA marker.....	Top-Bio, ČR
dNTP.....	Roche, Německo
EDTA.....	Serva, Německo
Ethanol.....	Penta, ČR
GelRed.....	Biotium, USA
glukóza (D-(+)-glukóza).....	Sigma, USA
hydroxid draselný.....	Penta, ČR
hydroxid sodný.....	Penta, ČR
kyselina boritá.....	Lachema, ČR
kyselina chlorovodíková.....	Penta, ČR
PCR vkladací pufr.....	Top-Bio, ČR
primery pro PCR.....	Generi Biotech, ČR
Taq polymeráza.....	Roche, Německo
Tris.....	Sigma, USA
Tris-HCl.....	Sigma, USA

4.1.2 Přístroje a materiál

analytické váhy.....	OHAUS, USA
aparatura na elektroforézu.....	Cleaver Scientific, Velká Británie
centrifuga Universal 320 R.....	Hettich, Německo
detekční proužky do glukometru.....	Bayer Consumer Care, Švýcarsko
glukometr Contour plus.....	Bayer Consumer Care, Švýcarsko
chirurgické nástroje.....	Medin, ČR
kapilární mikrozkrumavky.....	Sarstedt, Německo
magnetická míchačka.....	IKA, USA
membránový filtr 0.22 µm.....	Millipore, Německo

mikrozkumavky.....	Sarstedt, Německo
mini centrifuga.....	Labnet, USA
multikanálové pipety.....	Gilson, Francie
pH metr InLab level.....	WTW, Německo
pipety rozsahu 0.2 - 1000 μ l.....	Gilson, Francie
spektrofotometr Sunrise BASIC Tecan.....	Tecan, Švýcarsko
špičky pro pipety.....	Gilson, Francie
termální box.....	Sanyo, Japonsko
termoblok.....	Biometra, Německo
termocycler.....	Biometra, Německo
váhy ADAM.....	Adam Equipment, Velká Británie
vortex.....	Scientific Industries, USA
96-jamkové destičky.....	TPP Techno Plastic Products, Švýcarsko

4.2 Laboratorní zvířata a jejich chov

V pokusech byli použiti samci laboratorních myší (*Mus musculus*) inbredního kmene 129 S1/SvImJ, a to ve třech genetických variantách: (i) wild type (WT) myši, (ii) transgenní myši s expresí výlučně humánního PPAR α (hPPAR α), a dále (iii) myši s úplnou absencí PPAR α (PPAR α -KO). Zdrojem WT myší bylo chovné a dodavatelské zařízení The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA), zatímco chovné páry hPPAR α a PPAR α -KO myši pocházely z laboratoře Dr. F. Gonzaleze (Laboratory of Metabolism, National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA). Chovné páry dovezené do zvěřince odd. Biologie tukové tkáně Fyziologického ústavu AV ČR v roce 2015 byly využity k založení nové myší kolonie. Myši v chovu měly *ad libitum* přístup ke standardní chovné dietě Ssniff M-Z Mouse breeding (Ssniff, Německo) a pitné vodě, a byly ustájeny za standardních podmínek, tj. teplota zvěřince 22 ± 2 °C, vlhkost 55 ± 5 %, režim světlo : tma (12:12 h, světlo od 6:00). Kolonie kontrolních myší kmene 129 S1/SvImJ (WT) byla udržována standardním způsobem, tj. pomocí křížení bratr-sestra. Pro přípravu hPPAR α a PPAR α -KO myší byl postup zavedený v laboratoři Dr. Gonzaleze, tj. byly kříženy heterozygotní hPPAR α samci (+/-) s PPAR α -KO samicemi (-/-). Za účelem genotypizace hPPAR α a PPAR α -KO myší byla zvířatům při odstavu ve věku 4 týdnů odebrána část ušního boltce (viz níže – kapitola

Metody). Po odstavu byla zvířata krmena standardní udržovací dietou Ssniff R/M control diet (Ssniff, Německo). Zvířata určená pro další chov byla poprvé připouštěna až ve věku 3 měsíců.

4.3 Průběh experimentu, experimentální diety

K pokusům byli využiti myši samci ve věku ~5 měsíců ($n = 5-8$), kteří byli v průběhu pokusu chováni jednotlivě v klecích s neomezeným přístupem k vodě a příslušným experimentálním dietám: (i) standardní udržovací dieta Ssniff R/M control diet (Chow), (ii) obezogenní vysokotuková dieta [cHF; obsah lipidů ~32 g/100 g diety (Tabulka 1)], a (iii) cHF dieta suplementovaná koncentrátem n-3 PUFA ve formě esterů vosku izolovaných ze zooplanktonu *Calanus finmarchicus* ($\omega 3$ Cal). Vysokotukové diety byly připraveny ve zvěřinci odd. Biologie tukové tkáně Fyziologického ústavu AV ČR podle rozpisu (viz Tabulka 2). Vysokotukové diety jsou založeny převážně na kukuřičném oleji, ve kterém převažují (~50%) n-6 PUFA. V případě $\omega 3$ Cal diety byla část kukuřičného oleje nahrazena koncentrátem n-3 PUFA izolovaného ze zooplanktonu *Calanus finmarchicus* (dar firmy Calanus AS, Tromsø, Norsko). Obsah EPA a DHA v $\omega 3$ Cal dietě byl ~3.5 g EPA a 3.2 g DHA na 1 kg diety, v cHF dietě byl obsah EPA a DHA pod hranici detekce. Tělesná hmotnost a spotřeba diety (v průběhu 24 hod) byly měřeny 1x týdně. Experimentální diety byly podávány po dobu 8 týdnů. V průběhu 7. týdne byla odebrána krev v postprandiálním stavu, a v průběhu 8. týdne byl proveden glukózový toleranční test (viz níže). Na začátku 9. týdne byla provedena disekce s odběrem vzorků tkání a plasmy.

Tabulka 1: Energetický obsah diet (makronutrienty)

Energetický obsah diet	Chow		cHF		$\omega 3$ Cal	
	g/kg diety	%	g/kg diety	%	g/kg diety	%
bílkoviny	169	19.3	117	9.1	114	8.8
sacharidy	643	73.5	472	36.9	476	36.8
tuky	29	7.2	318	54.0	324	54.4
Celkový energetický obsah	14.9 MJ/kg diety		21.8 MJ/kg diety		21.8 MJ/kg diety	

Tabulka 2: Příprava vysokotukových diet

na 1 kg diety	cHF	ω3Cal
Standardní dieta (Ssniff R/M control diet, Ssniff, Německo)	400 g	400 g
Sunar (Hero, Švýcarsko)	340 g	340 g
kukuřičný škrob (Maizena, ČR)	10 g	10 g
kukuřičný olej (Oleofarm, Polsko)	250 g	197.5 g
olej z <i>C. finmarchicus</i> (Calanus AS, Norway)	0 g	52.5 g
z toho EPA + DHA	< 0.1 g	6.7 g

4.4 Ukončení pokusu, odběr a skladování biologického materiálu

Myši byly uspány v éterové narkóze a usmrceny dislokací krční páteře. Z krční tepny jim byla odebrána krev do 1.5 ml mikrozkuřavky s 5 µl 0.5M EDTA. Mikrozkuřavky byly centrifugovány při 5320 g a teplotě 4 °C po dobu 10 minut. Plasma (supernatant) byla rozpipetována do mikrozkuřavek a uskladněna při -80 °C. Odebrané tkáně byly zváženy, okamžitě zamrazeny v tekutém dusíku a následně uchovávány při teplotě -80 °C.

4.5 Genotypizace

4.5.1 Izolace DNA

Pro křížení i vybírání vhodných samců do pokusu bylo nutné genotypizovat myši hPPARα (+/-) a PPARα-KO (-/-). Každému jedinci byla ve věku přibližně jednoho měsíce ušřížena část ušního boltce, která byla uskladněna v mikrozkuřavce při -20 °C. Pro izolaci DNA bylo do mikrozkuřavky s tkání přidáno 300 µl 50mM NaOH, mikrozkuřavka byla vortexována, stočena na mini centrifuze a na 10 minut umístěna do termobloku s nastavenou teplotou 95 °C. Následně byla zkuřavka vortexována, stočena na mini centrifuze, bylo přidáno 25 µl 1M Tris-HCl a zkuřavka opět vortexována. Vzorky mohly být použity přímo pro další zpracování nebo byly uskladněny v -20 °C.

4.5.2 PCR

Pro namnožení a následnou detekci DNA bylo použito metody PCR za pomoci primerů nově navržených pomocí softwaru Lasergene 7.1 (DNASTAR, USA) - viz Tabulka 3, které se liší od primerů uvedených v publikaci Yang *et al.* (Yang et al., 2008). Primery pro myši PPARα byly použity především pro ověření nepřítomnosti genu myšího PPARα

u transgenní hPPAR α a PPAR α -KO linie, zatímco primery pro humánní formu PPAR α sloužily pro rozlišení hPPAR α a PPAR α -KO myši.

Tabulka 3: Sekvence primerů pro detekci PPAR α

Gen	Sekvence	Délka produktu (bp)	Teplota nasedání (°C)
humánní PPAR α	F – 5'-GCATCCAGAGAACAACCGTAATC-3' R – 5'CCATCTGGAAACAGTAAATTAAACCTTC-3'	69	55
myši PPAR α	F – 5'-GAGAAGTTGCAAGGAGGGGATTGTG-3' R – 5'-CCCATTTCGGTAGCAGGTAGTCTT-3'	400	60

Primery byly uchovávány v -20 °C, před použitím je bylo nutné 10x naředit redestilovanou vodou na pracovní koncentraci. Pro PCR reakci byl namíchán roztok master mixu (složení viz Tabulka 4). Od každého vzorku s izolovanou DNA bylo odebráno 0.5 μ l a přidáno k 11.65 μ l master mixu v 0.5ml mikrozkuhavce. Mikrozkuhavky byly umístěny do termocycleru s programem popsáným v Tabulce 5, který byl odlišný pro myši a humánní PPAR α z důvodu rozdílné teploty nasedání primerů. Po ukončení programu byly mikrozkuhavky uskladněny v -20 °C, nebo použity přímo pro přípravu vzorků na gelovou elektroforézu.

Tabulka 4: Složení master mixu pro jeden vzorek

	Objem (μ l)
voda	8.60
10x PCR pufr	1.25
dNTP	0.25
primer F	0.65
primer R	0.65
Taq polymeráza	0.25
Celkem:	11.65

Tabulka 5: Nastavení jednotlivých fází PCR

	Cílová teplota (°C)		Doba udržování teploty
	humánní PPAR α	myši PPAR α	
Počáteční denaturace	94	94	2 min
Amplifikace 30 cyklů			
Denaturace	94	94	30 s
Nasednutí primerů	55	60	30 s
Elongace	72	72	1 min
Závěrečná elongace	72	72	7 min

4.5.3 Gelová elektroforéza

Elektroforéza slouží k oddělení nabitých látek, v tomto případě záporně nabitých molekul DNA, podle jejich pohyblivosti v elektrickém poli. Menší molekuly migrují v gelu rychleji, proto jsou molekuly DNA rozděleny podle velikosti. K odečtení přibližné velikosti molekul slouží marker, k jejich zviditelnění v UV záření je pak použito fluorescenční barvivo interkalující do DNA.

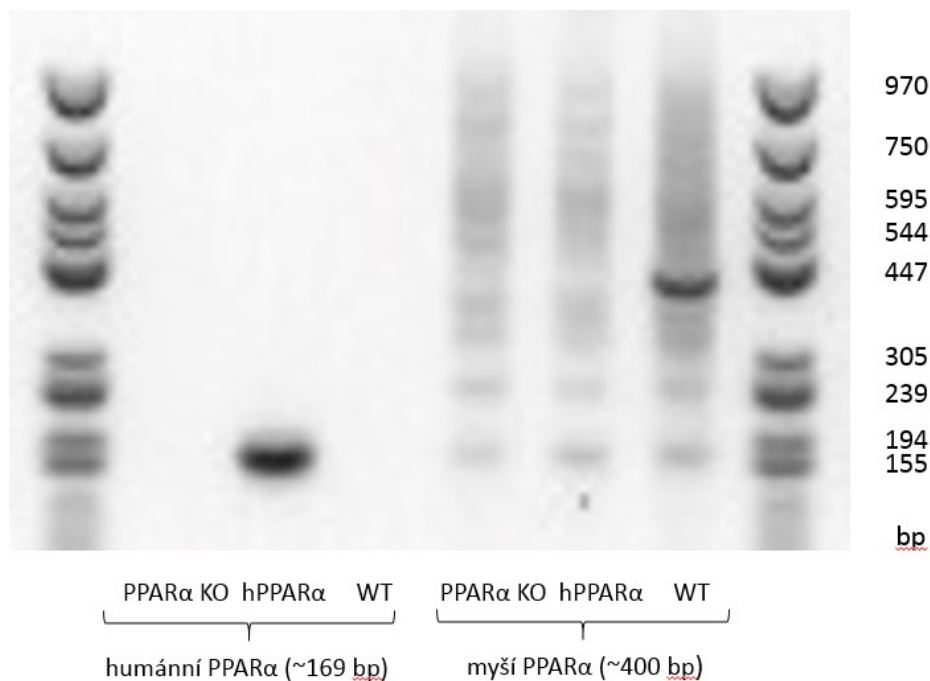
Roztok TBE

Pro přípravu 1 litru 5x koncentrovaného roztoku TBE jsou potřeba následující chemikálie (viz Tabulka 6) a vše je doplněno destilovanou vodou do objemu 1 litru, přičemž pracovní roztok (1x TBE) se připraví ředěním (5x) pomocí destilované vody.

Tabulka 6: Množství chemikálií pro přípravu 1 litru 5x koncentrovaného TBE

Chemikálie	Množství
Tris	54.0 g
kyselina boritá	27.5 g
0.5M EDTA pH 8	20.0 ml

Byl připraven 1.5% agarózový gel o objemu 50 ml do formy pro nalévání gelů. Roztok vzniklý smícháním 0.75 g agarózy s 50 ml 1x TBE postupně zahříváme za občasného míchání v mikrovlnné troubě. Po rozpuštění agarózy roztok necháme vychladnout na ~60 °C, přidáme 5 µl interkalačního barviva GelRed, rozmícháme, nalijeme do formy, vložíme hřebínek a necháme tuhnout 20 min. Po utužení formu rozebereme, gel vložíme do aparatury na elektroforézu a zalijeme 1x TBE. DNA marker (155-970 coloured, LotNo C109) byl připraven smícháním s vkladacím pufrem a redestilovanou vodou v poměru 2:1:3. Ke každému vzorku z PCR se přidaly 3 µl nanášecího pufru a vše se zvortexovalo. DNA marker (9.6 µl) a jednotlivé vzorky (5 µl) včetně pozitivní a případně negativní kontroly byly nanесeny do jamek gelu a zahájena elektroforéza při napětí 40 V po dobu ~3 h. Gel byl následně zdokumentován pod UV lampou a vyhodnocen na základě přítomnosti produktů příslušné PCR reakce – viz Obrázek 6.

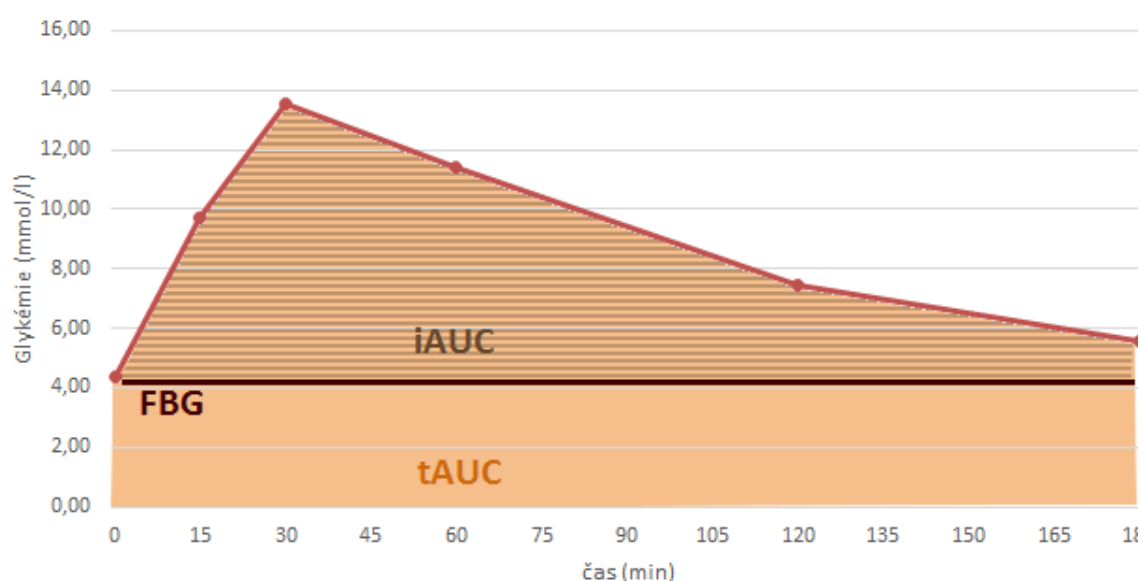


Obrázek 6: Kontrolní gel pro stanovení funkčnosti primerů

4.6 Intraperitoneální glukózový toleranční test

Týden před ukončením pokusu byl u myši proveden intraperitoneální glukózový toleranční test (IPGTT) za účelem charakterizace změn v glukózové homeostáze organismu. Předem byl připraven 10% roztok D-glukózy, kdy na přípravu 1 litru roztoku bylo použito 100 g D-(+)-glukózy a doplněno do objemu 1 litru destilovanou vodou. Roztok byl důkladně promíchán magnetickým míchadlem na mírně zahřátém vařiči, přefiltrován (velikost pórů filtru $\sim 0.22 \mu\text{m}$), rozplněn do zkumavek a následně skladován při -20°C . Myši byly večer před pokusem zváženy a před začátkem temné fáze dne (18:00) jim byla odebrána dieta. Druhý den ráno kolem 9:00 (~ 15 hodin hladovění) byly myši znovu zváženy a změřena glykémie nalačno (FBG) pomocí glukometru s detekčními proužky. Zároveň bylo myším z ocasu odebráno $\sim 100 \mu\text{l}$ smíšené krve do kapilárních mikrozkušavek s EDTA. Mikrozkušavky byly centrifugovány při 5320 g a teplotě 4°C po dobu 10 minut. Plasma (supernatant) byla přepipetována do mikrozkušavek a uskladněna při -80°C . Následně byl myším pomocí intraperitoneální injekce podán roztok 10% glukózy v dávce 1 mg/g tělesné hmotnosti (tj. $10 \mu\text{l}$ roztoku glukózy/g tělesné hmotnosti), a v časových bodech 15, 30, 60, 120 a 180 min od podání glukózy jim byla měřena glykémie. Po ukončení pokusu byl myším opět umožněn přístup k jejich experimentálním dietám.

V rámci vyhodnocovaných parametrů byl počítán úbytek hmotnosti myši během hladovění, a dále byl pro každou myš zkonstruován graf popisující změny glykémie v průběhu pokusu, tj. glykemická křivka pro posouzení stavu glukózové tolerance. Byla kalkulována celková plocha pod glykemickou křivkou (AUC), která vyjadřuje míru glukózové intolerance. Jelikož celková AUC může být značně ovlivněna hodnotou FBG, byla též vypočtena hodnota inkrementální AUC (Obrázek 7), tj. velikost plochy pod glykemickou křivkou po odečtení hodnoty FBG, která asi více reflektuje periferní citlivost organismu k inzulinu.



Obrázek 7: Glykemická křivka

U glykemické křivky se hodnotí bazální hladina glykémie a plocha pod křivkou. Pro výpočet inkrementální plochy pod křivkou jsou odečteny bazální hladiny glykémie.

iAUC – inkrementální plocha pod křivkou, tAUC – celková plocha pod křivkou, FBG – bazální hladina glykémie

4.7 Odběr krve v postprandiálním stavu

Za účelem dosažení postprandiálního stavu byly myši nejdříve ponechány bez přístupu k potravě během světlé fáze dne (tj. na dobu 12 hodin), a pak těsně před začátkem tmavé fáze dne (18:00) jim byla jejich experimentální dieta navracena do klece. Jelikož je tmavá část dne u myši spojena s aktivací příjmu potravy, myši začaly potravu umístěnou do klece více méně okamžitě konzumovat. Po 3 h od navracení potravy do klece pak byl

v místnosti s minimálním zdrojem osvětlení proveden odběr přibližně 100 µl smíšené krve z ocasu do kapilární mikrozkuřavky s EDTA. Mikrozkuřavky byly centrifugovány při 5320 g a teplotě 4 °C po dobu 10 minut. Plasma (supernatant) byla přepipetována do mikrozkuřavek a uskladněna při -80 °C.

4.8 Stanovení lipidů a cholesterolu v plasmě

Ve vzorcích plasmy získané od myši v rámci disekce, IPGTT nebo odběru krve v postprandiálním stavu byly stanoveny koncentrace lipidových metabolitů včetně TAG, nenasycených mastných kyselin (NEFA), cholesterolu a tzv. HDL-cholesterolu, tj. cholesterolu asociovaného s apolipoproteinem Apo-A1 v HDL částicích. K měření byly použity diagnostické soupravy včetně příslušných standardů dodaných výrobcem (Erba Lachema, ČR pro TAG, cholesterol a HDL-cholesterol; Wako Chemicals GmbH, Německo pro NEFA). Obsah lipidů i cholesterolu ve vzorcích je stanovován spektrofotometricky na spektrofotometru po proběhnutí reakcí s komerčně dodávanými činidly na 96-jamkové destičce. U každé destičky byly 4 jamky použity pro blank (pozadí reakce) a 4 jamky pro standard, jejich hodnoty pak byly zprůměrovány. Principem metody je měření změny absorbance, ke které dochází reakcí barviva s detekovanou látkou. Míra absorbance pak po odečtení hodnoty blanku a porovnání s absorbancí standardu přímo úměrně odpovídá množství dané látky. Při dodržení rozmezí pracovního rozsahu koncentrací daného výrobcem se hodnoty standardu i vzorků nacházely v lineární části kalibrační křivky. Při lineární závislosti veličin v rozmezí pracovního rozsahu koncentrací daného výrobcem je možné výsledky vyhodnotit za použití následujícího vzorce:

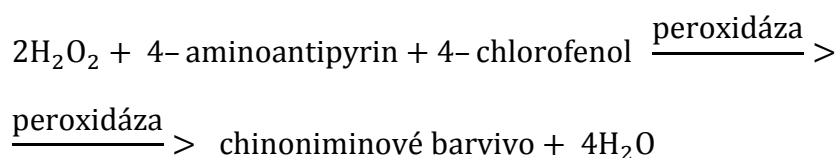
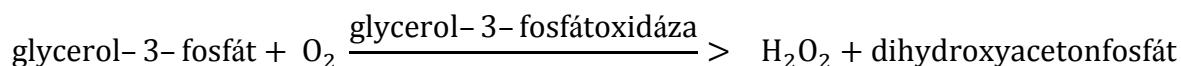
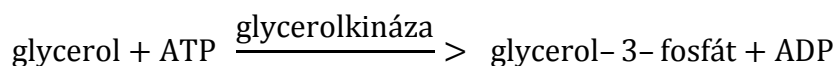
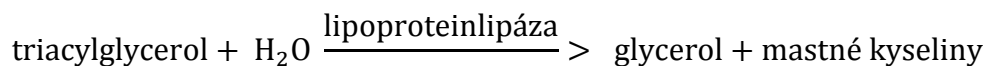
$$C_{vz} (mmol/l) = \frac{Abs_{vz}}{Abs_{std}} \cdot C_{std} (mmol/l) ,$$

kde C značí koncentraci a Abs absorbanci vzorku (vz) nebo standardu (std).

4.8.1 TAG

Do každé jamky byly napipetovány 3 µl vzorku, respektive standardu nebo redestilované vody pro blank. Po přidání 300 µl činidla byla destička na 10 minut umístěna na třepačku v termostatu při 37 °C v temnu. Následně byla změřena absorbance v jamkách na spektrofotometru při vlnové délce 500 nm.

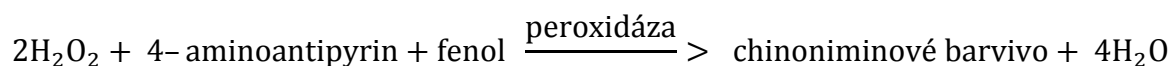
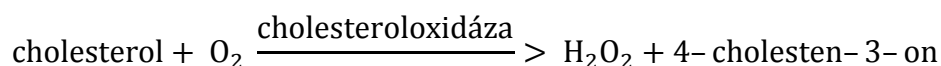
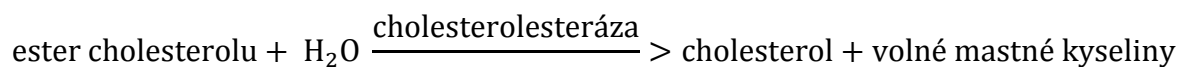
Princip metody



4.8.2 Cholesterol

Do každé jamky byly napipetovány 3 µl vzorku, respektive standardu nebo redestilované vody pro blank. Po přidání 300 µl činidla byla destička na 10 minut umístěna na třepačku v termostatu při 37 °C v temnu. Následně byla změřena absorbance v jamkách na spektrofotometru při vlnové délce 500 nm.

Princip metody



4.8.3 HDL-cholesterol

Do každé jamky byly pipetovány 2 µl vzorku, respektive standardu nebo redestilované vody pro blank. Po přidání 180 µl činidla R1 byla destička na 5 minut umístěna

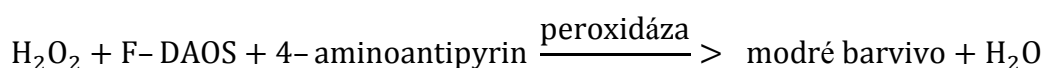
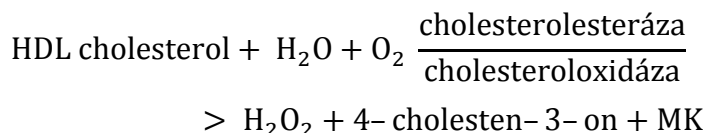
na třepačku v termostatu při 37 °C v temnu. Následně byla změřena absorbance č. 1 v jamkách na spektrofotometru při vlnové délce 600 nm. Po přidání 60 µl činidla R2 byla destička opět na 5 minut umístěna v termostatu a následně změřena na spektrofotometru při vlnové délce 600 nm. Od výsledné absorbance č. 2 byla odečtena absorbance č. 1 z prvního měření a pro vyhodnocení byla použita tato rozdílná hodnota.

Princip metody

Reakční činidlo č. 1 zablokuje reakce s cholesterolem ze všech lipoproteinových částic kromě HDL.

LDL, VLDL, chylomikrony $\frac{\text{protilátka proti } \beta \text{ lipoproteinům}}{\text{protilátka proti } \beta \text{ lipoproteinům}} > \text{komplex antigen– protilátka}$

Reakční činidlo č. 2 reaguje už jen s HDL částicemi za vzniku substituovaného chinondiiminu fungujícího jako modré barvivo.

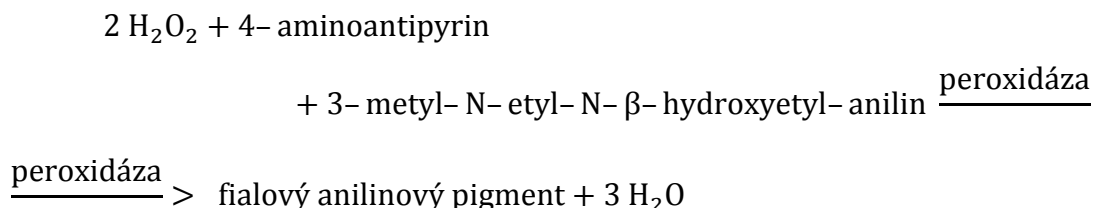
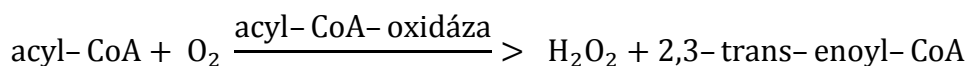
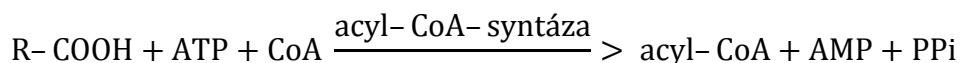


(F-DAOS = [N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxy-4-fluoroanilin, sodná sůl])

4.8.4 NEFA

Do každé jamky byly napipetovány 2 µl vzorku, respektive standardu nebo redestilované vody pro blank. Po přidání 86 µl činidla R1 byla destička na 10 minut umístěna na třepačku v termostatu při 37 °C v temnu. Do jamek bylo přidáno 43 µl činidla R2 a destička byla po dalších 10 minutách v termostatu změřena na spektrofotometru při vlnové délce 546 nm.

Princip metody



4.9 Stanovení lipidů ve tkáni

Zamražené vzorky tkání byly vloženy do 2ml mikrozkušavek se 150 μl 3M KOH v 65% ethanolu, mikrozkušavky byly vortexovány a umístěny na 1 h do termobloku zahřátého na teplotu 70 °C, poté zvortexovány, stočeny na mikrocentrifuze a opět umístěny na 1 h do termobloku. Na konci inkubace byly mikrozkušavky opět zvortexovány a stočeny. Vzorky rozpuštěných tkání byly naředěny (viz Tabulka 7). U naředěných vzorků byl změřen obsah lipidů stejným postupem, jaký byl použit v případě měření TAG v plasmě (viz výše). Pro výpočet obsahu lipidů ve tkáni (mg lipidů/g tkáně) bylo nutné při kalkulaci zohlednit naředění rozpuštěné tkáně a hmotnost fragmentu tkáně vstupující do reakce.

Tabulka 7: Odlišné ředění tkání

Tkáň	Ředění
játra	10x
kosterní sval	5x
srdce	5x
BAT	40x

4.10 Statistické vyhodnocení

V rámci experimentálních skupin byly vypočítány aritmetické průměry se směrodatnou odchylkou. Výsledky byly analyzovány pomocí jednocestné ANOVA v programu Excel (Microsoft, USA). Hodnoty $P < 0.05$ byly považovány za statisticky významné.

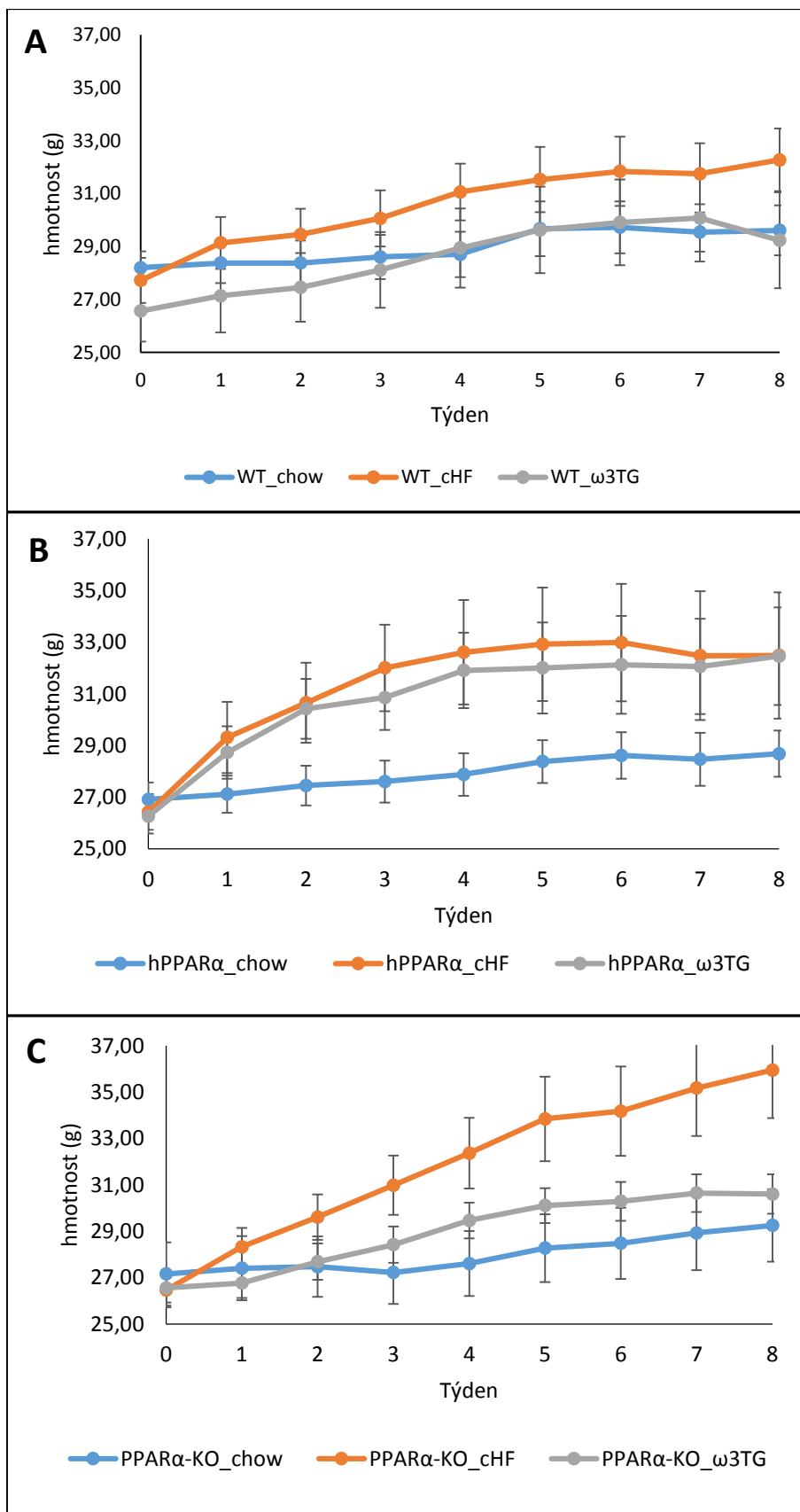
5. Výsledky

V provedeném experimentu bylo porovnáváno 9 skupin myší. Z hlediska genotypu byly porovnávány skupiny transgenních hPPAR α myší, dále PPAR α -KO myší s absencí PPAR α , spolu s kontrolní skupinou WT myší divokého kmene. V rámci těchto skupin byly podávány tři různé diety, tj. standardní (Chow), vysokotuková (cHF) nebo vysokotuková cHF dieta suplementovaná n-3 PUFA koncentrátem v podobě oleje ze zooplanktonu *Calanus finmarchicus* (ω 3Cal) (složení diet viz kapitola Metody). Záměrem bylo především porovnat vliv podávání odlišných diet v rámci jednotlivých genotypů.

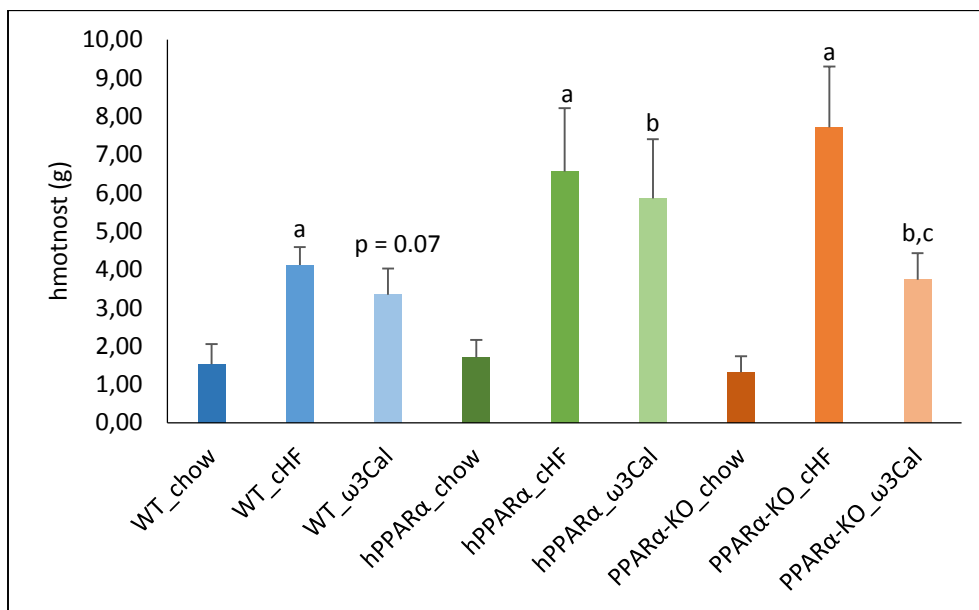
5.1 Přírůstek tělesné hmotnosti a spotřeba diety

Tělesná hmotnost a spotřeba diety v průběhu pokusu byly monitorovány 1x týdně, přičemž oba sledované parametry jsou důležité pro monitoring energetické bilance organismu.

Průběh křivek tělesné hmotnosti po dobu trvání pokusu je znázorněn na Obrázku 1; v rámci jednotlivých genotypů byl u myší konzumujících vysokotukovou cHF dietu zaznamenán nárůst tělesné hmotnosti oproti myším na kontrolní Chow dietě (Obrázek 8), nicméně na konci pokusu při disekci byl signifikantní rozdíl v tělesné hmotnosti mezi zvířaty na cHF a Chow dietě přítomen pouze u PPAR α -KO myší (Tabulka 8). Za zmínku stojí, že během 7. a 8. týdne došlo u části skupin k zastavení nárůstu tělesné hmotnosti, případně i k poklesu tělesné hmotnosti zřejmě z důvodu provádění odběru krve v postprandiálním stavu a v důsledku IPGTT. Na druhou stranu skupina PPAR α -KO myší krmených cHF dietou (Obrázek 8-C) se nezdála být v tomto směru výrazně ovlivněna. Z důvodu možného ovlivnění tělesné hmotnosti prováděním odběru krve a IPGTT v 7. respektive 8. týdnu experimentu byl pro výpočet přírůstku tělesné hmotnosti a jeho porovnání v rámci jednotlivých skupin hodnocen pouze časové období do 6. týdne experimentu (Obrázek 9 a Tabulka 8).



Obrázek 8: Přírůstek tělesné hmotnosti v průběhu experimentu
A – WT; B – hPPAR α ; C – PPAR α -KO

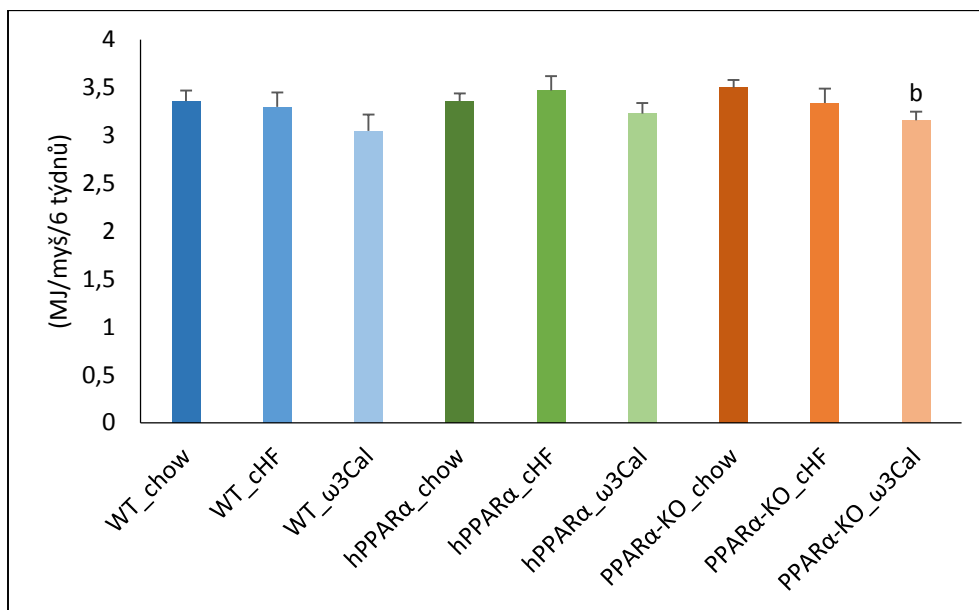


Obrázek 9: Hmotnostní přírůstek za období 6 týdnů

^a $p \leq 0.05$ pro cHF vs. Chow, ^b $p \leq 0.05$ pro $\omega 3$ Cal vs. Chow, ^c $p \leq 0.05$ pro $\omega 3$ Cal vs. cHF

Obecně je tak účinek cHF a $\omega 3$ Cal diety lépe dokumentován na základě výpočtu přírůstku tělesné hmotnosti v týdnech 0 až 6 (Obrázek 9 a Tabulka 8), kdy k signifikantnímu nárůstu tělesné hmotnosti ve srovnání se zvířaty na Chow dietě došlo u všech sledovaných genotypů. Vliv podávání $\omega 3$ Cal diety se projevil pouze u myši ve skupině PPAR α -KO, kdy hmotnostní přírůstek myši konzumujících tuto dietu byl významně odlišný od myši na Chow i cHF dietě.

Nejvyšší průměrná spotřeba diety byla obecně u skupin myši krmených Chow dietou (4.66 g/myš/den), nejnižší naopak u $\omega 3$ Cal diety (2.95 g/myš/den oproti 3.07 g/myš/den u cHF). Statisticky významný rozdíl mezi cHF a $\omega 3$ Cal dietou pak byl pouze u WT skupiny (viz Tabulka 8). Kontrolní dieta ve srovnání s vysokotukovými (tj. cHF a $\omega 3$ Cal) dietami však má odlišný energetický obsah, a proto byla na bázi energetické hodnoty vypočítána kumulativní spotřeba potravy za období 6 týdnů, která se ale signifikantně lišila pouze v rámci PPAR α -KO myši mezi skupinami myši na $\omega 3$ Cal a Chow dietě (Obrázek 10). I v ostatních skupinách však byl u myši na $\omega 3$ Cal dietě naznačen pokles spotřeby energie přijaté dietou. Významné snížení hmotnosti u PPAR α -KO myši krmených $\omega 3$ Cal dietou by tak mohlo být způsobeno též sníženým příjmem potravy.



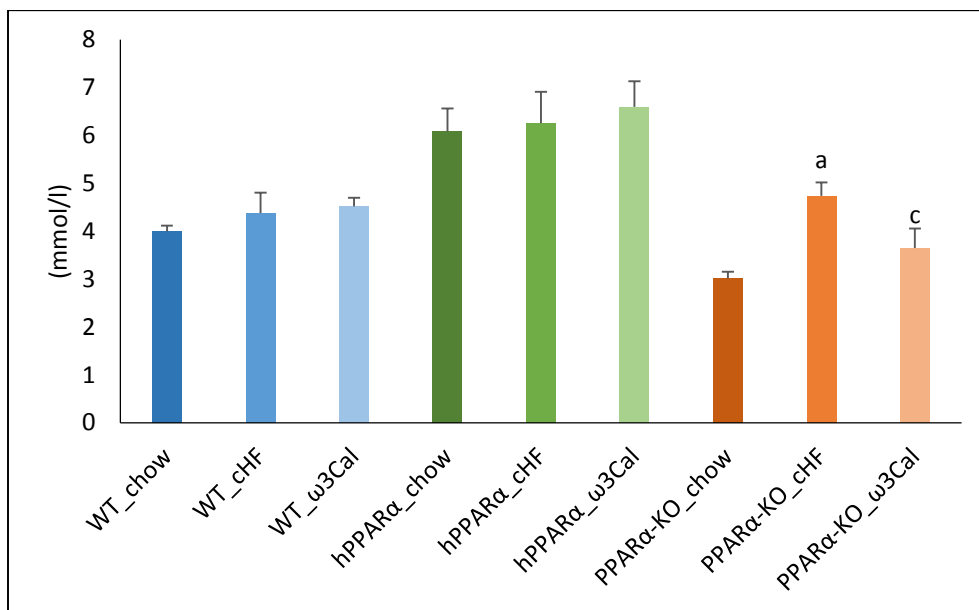
Obrázek 10: Kumulativní spotřeba energie v rámci přijaté potravy za období 0-6 týdnů

^b $p \leq 0.05$ pro $\omega 3\text{Cal}$ vs. Chow

5.2 Intraperitoneální glukózový toleranční test

IPGTT byl proveden v průběhu 8. týdne experimentu. Myším byla změřena glykémie nalačno (FBG) a po odběru přibližně 100 μl smíšené krve z ocasu jim byla aplikována dávka 10% roztoku glukózy v množství 10 μl na gram tělesné váhy. FBG se významně lišila u myši krmených různými dietami pouze v rámci PPAR α -KO skupiny, kde myši na Chow dietě vykazovaly již značnou hypoglykémii a vůči nim byla významně zvýšena glykémie ve skupině myši na cHF dietě. U myši na $\omega 3\text{Cal}$ dietě ve srovnání s Chow skupinou ke zvýšení glykémie nedošlo, ale tyto myši měly naopak FBG oproti cHF skupině významně sníženou (Obrázek 11).

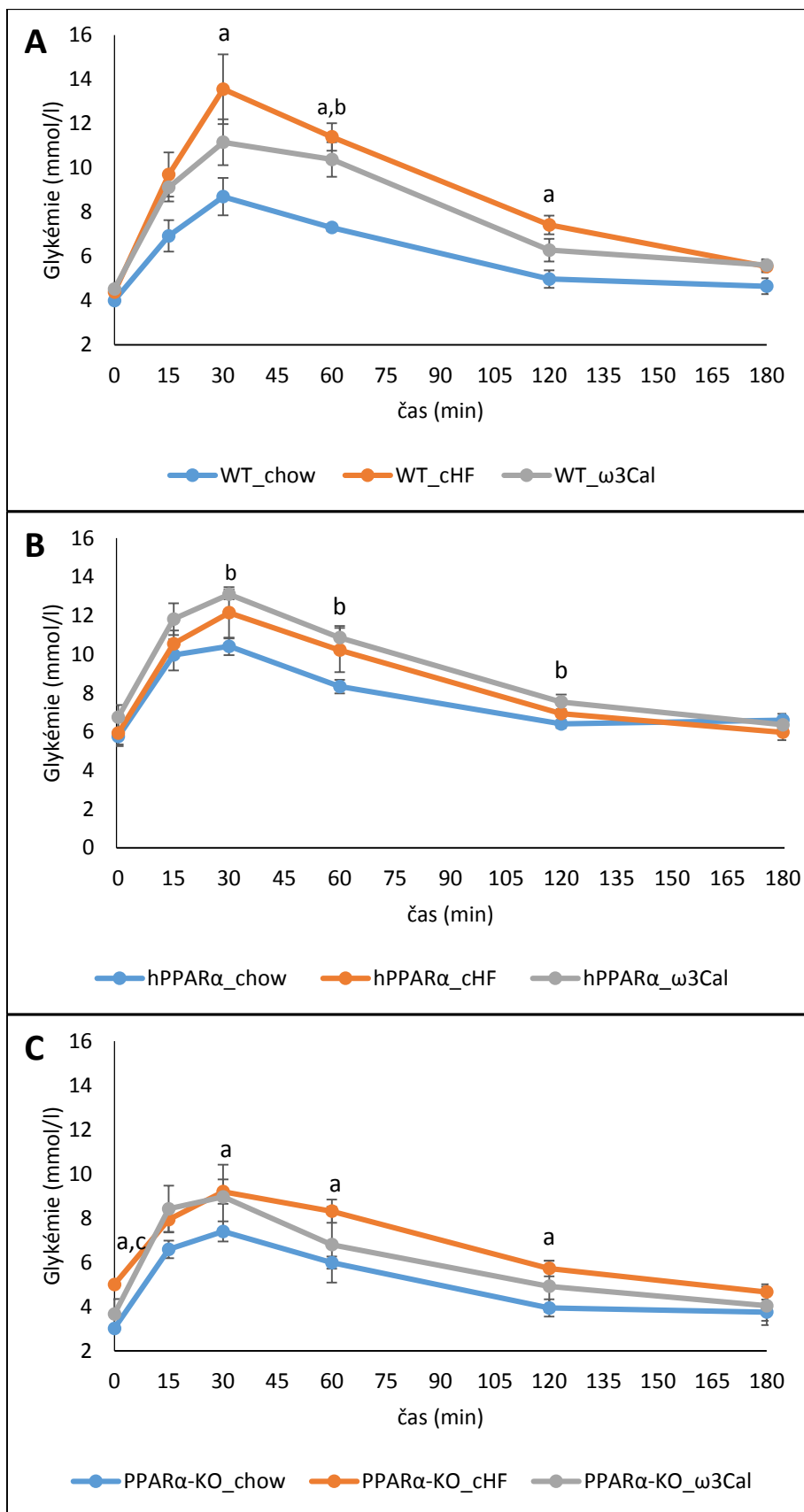
Z hodnot glykémie naměřených v průběhu IPGTT byly sestaveny glykemické křivky (Obrázek 12). Signifikantně zvýšené hodnoty glykémie měly myši krmené cHF dietou ve skupině WT a PPAR α -KO, naopak v případě hPPAR α myši se jednalo o myši na $\omega 3\text{Cal}$ dietě, které měly nejvyšší hodnoty glykémie v průběhu IPGTT.



Obrázek 11: Glykémie nalačno (tj. FBG)

^a $p \leq 0.05$ pro chF vs. Chow, ^c $p \leq 0.05$ pro $\omega 3\text{Cal}$ vs. chF

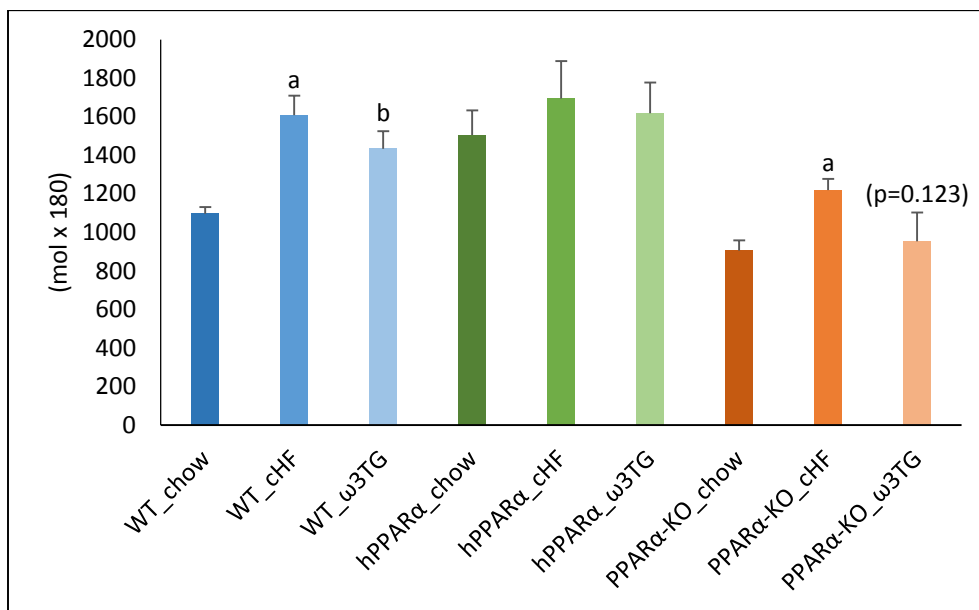
O míře glukózové tolerance pak dobře vypovídá parametr AUC, ať už se jedná o tAUC nebo iAUC, která zohledňuje odlišnosti v FBG, ale nezapočítává hodnoty při poklesu glykémie pod úroveň FBG. K signifikantním změnám v glukózové toleranci došlo u skupiny WT, kde byly hodnoty tAUC a iAUC signifikantně zvýšené u myší krmených chF dietou, v případě WT myší na $\omega 3\text{Cal}$ dietě byl statisticky významný rozdíl (vs. Chow) zjištěný u tAUC, zatímco u iAUC byl tento rozdíl na hranici signifikance ($p = 0.076$) (Obrázek 13 a 14). Myši na různých dietách ve skupině hPPAR α se nelišily, naopak v PPAR α -KO skupině byl v případě tAUC statisticky významný rozdíl pouze mezi skupinami Chow a chF, což zřejmě odpovídá zvýšené FBG u chF skupiny. U myší na $\omega 3\text{Cal}$ dietě byl ve srovnání s chF skupinou naopak naznačen pokles tAUC ($p = 0.123$). Naměřené hodnoty parametrů glukózové homeostázy jsou také shrnuty v Tabulce 9.



Obrázek 12: Glykemické křivky v průběhu IPGTT

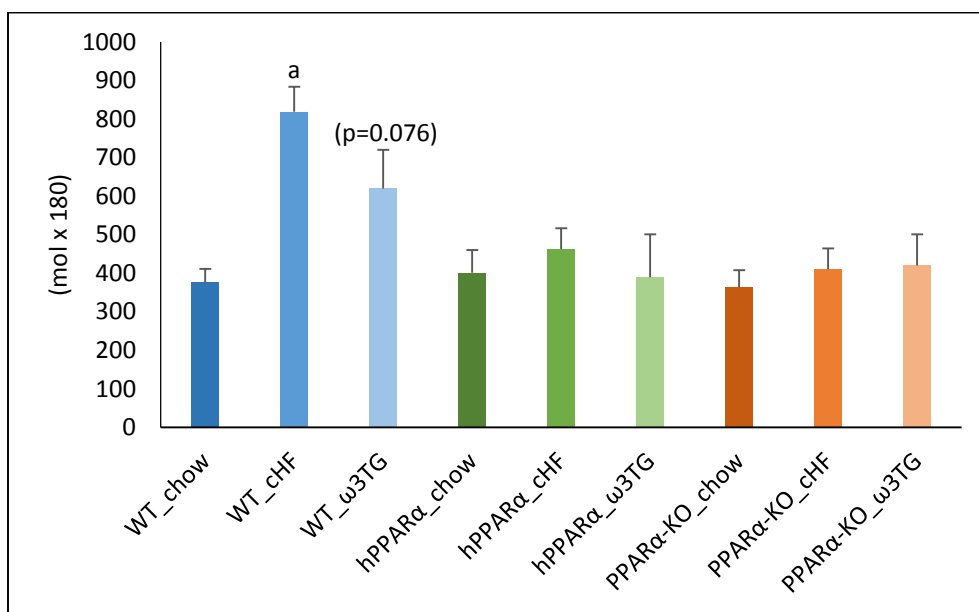
A – WT; B – hPPARα; C – PPARα-KO

^ap≤0.05 pro cHF vs. Chow, ^bp≤0.05 pro ω3Cal vs. Chow, ^cp≤0.05 pro ω3Cal vs. cHF



Obrázek 13: Míra glukózové intolerance měřená jako tAUC

^ap < 0.05 pro cHF vs. Chow, ^bp < 0.05 pro ω3Cal vs. Chow



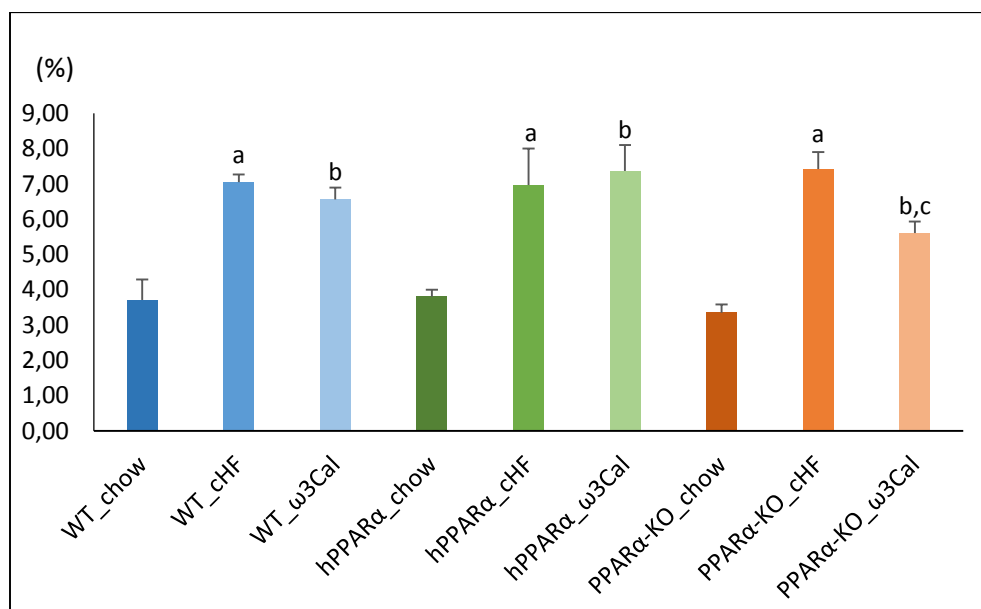
Obrázek 14: Míra glukózové intolerance měřená jako iAUC

^ap < 0.05 pro cHF vs. Chow

Závěrem tedy podávání ω3Cal diety u PPARα-KO myši signifikantně snižovalo FBG a současně mělo tendenci snižovat i tAUC. V případě WT skupiny nebyl účinek ω3Cal diety pozorován, naopak u myši genotypu hPPARα vedlo podávání ω3Cal diety k nárůstu glykémie (vs. Chow) v průběhu IPGTT, nicméně ve výpočtech AUC ani v případě FBG se tento fakt významně neprojevil.

5.3 Analýza tkání *ex vivo*

Během pitvy byla zjišťována hmotnost dvou viscerálních tukových dep (tj. gonadální a mesenterické), a dále hmotnost subkutánního depa v dorso-lumbální lokalizaci. Váženy byly rovněž i tkáně, ve kterých byl následně měřen obsah lipidů. Jednalo se o játra, srdce, kosterní sval (*musculus quadriceps femoris*) a BAT. Zvýšená akumulace lipidů ve tkáních senzitivních k inzulinu může značit rozvoj IR. Naměřené hodnoty jsou shrnuty v Tabulce 8, 11 a 12. U myši na cHF dietě došlo k signifikantnímu zvýšení hmotnosti tukových dep. Naopak u zvířat krmených ω 3Cal dietou ve skupině WT a PPAR α -KO myši nedošlo v případě mesenterického depa k signifikantnímu nárůstu hmotnosti ve srovnání se zvířaty na Chow dietě, navíc u PPAR α -KO myši na ω 3Cal dietě bylo pozorováno signifikantní snížení hmotnosti všech analyzovaných tukových dep ve srovnání se zvířaty na cHF dietě (Tabulka 11). Dále byl pro posouzení relativní hmotnosti tukových dep vzhledem k tělesné hmotnosti vypočítán index adipozity, a to jako součet hmotnosti všech analyzovaných tukových dep dělený tělesnou hmotností a vyjádřený v procentech. Obecně měly vyšší index adipozity skupiny zvířat krmené vysokotukovými dietami (tj. cHF a ω 3Cal), přičemž u PPAR α -KO myši krmených ω 3Cal dietou bylo opět pozorováno významné snížení indexu adipozity ve srovnání se zvířaty na cHF dietě (Obrázek 15).

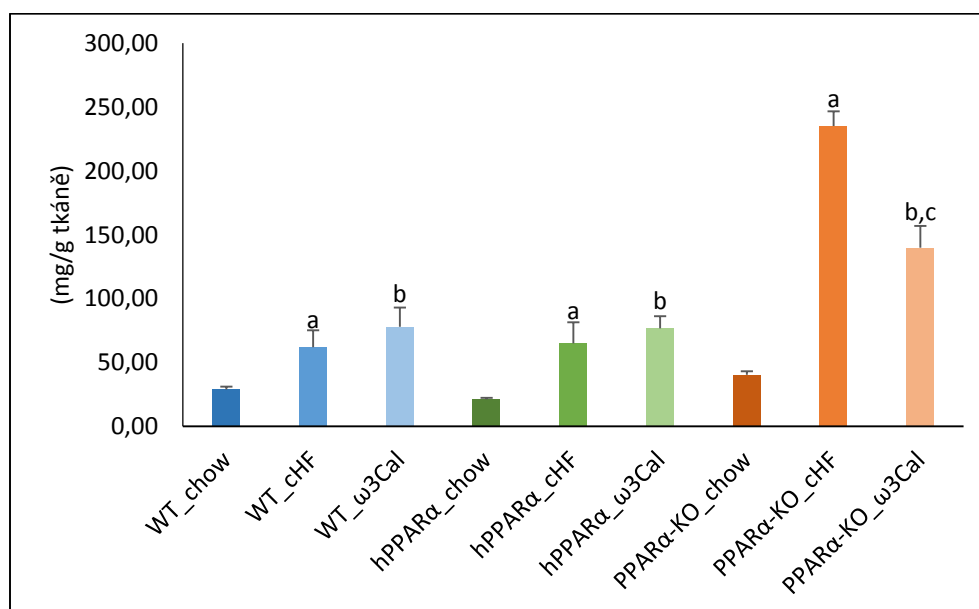


Obrázek 15: Index adipozity – poměr hmotnosti tukových dep vůči tělesné hmotnosti

^a $p \leq 0.05$ pro cHF vs. Chow, ^b $p \leq 0.05$ pro ω 3Cal vs. Chow, ^c $p \leq 0.05$ pro ω 3Cal vs. cHF

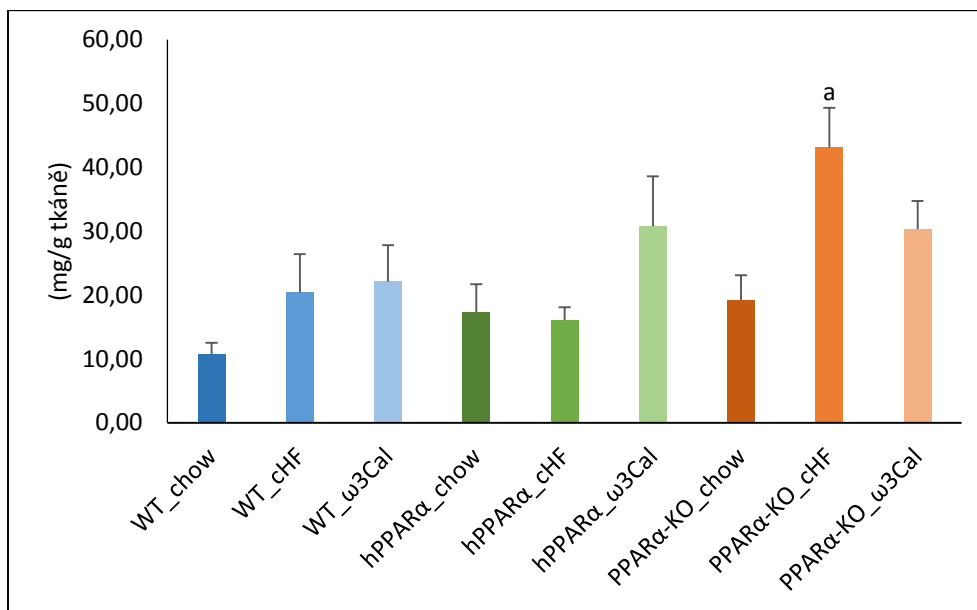
V hmotnostech tkání nebyl u BAT ani kosterního svalu mezi skupinami žádný statisticky významný rozdíl, hmotnost srdce pak byla signifikantně snížena pouze u PPAR α -KO myši na ω 3Cal dietě vůči cHF dietě ($p = 0.028$) (Tabulka 8), což mohlo být způsobeno obecně nižší tělesnou hmotností skupiny PPAR α -KO na ω 3Cal dietě. Překvapivě, u skupin WT (na cHF dietě) a hPPAR α (na cHF i ω 3Cal dietě) došlo k signifikantnímu poklesu hmotnosti jater ve srovnání se zvířaty na Chow dietě. Příčinou by mohla být zvýšená akumulace lipidů, které mají na jednotku objemu v důsledku hydrofobicity obecně nižší hmotnost než metabolicky aktivní tkáň. Naproti tomu PPAR α -KO myši krmené cHF dietou měly játra oproti Chow skupině významně zvětšená, což bylo zjevně způsobeno dysregulací lipidového metabolismu v důsledku absence PPAR α spojené s poškozením jater a velmi vysokým obsahem lipidů v játrech (viz Obrázek 16).

Ke zvýšené akumulaci lipidů v játrech došlo u všech skupin na vysokotukových dietách (tj. cHF a ω 3Cal), nicméně obsah lipidů v játrech byl u PPAR α -KO myši na ω 3Cal dietě oproti myším na cHF dietě výrazně snížen (Obrázek 16). Obdobný pokles v obsahu lipidů byl naznačen i u kosterního svalu v případě zvířat s PPAR α -KO genotypem ($p = 0.111$ ω 3Cal vs. cHF) (Obrázek 17). V ostatních skupinách nebyly pozorovány signifikantní rozdíly, a to ani v případě obsahu lipidů v srdci a BAT. Naměřené hodnoty parametrů akumulace lipidů ve tkáních jsou také shrnuty v Tabulce 12.



Obrázek 16: Akumulace lipidů v játrech

^a $p \leq 0.05$ pro cHF vs. Chow, ^b $p \leq 0.05$ pro ω 3Cal vs. Chow, ^c $p \leq 0.05$ pro ω 3Cal vs. cHF



Obrázek 17: Akumulace lipidů v kosterním svalu

^ap≤0.05 pro cHF vs. Chow

Celkově se tedy podávání vysokotukových diet (cHF a ω3Cal) projevilo zvýšením hmotnosti tukových dep včetně zvýšení indexu adipozity a nárůstem akumulace lipidů v játrech. Z důvodu narušeného lipidového metabolismu u PPARα-KO myši došlo v případě zvířat krmených cHF dietou k velmi vysoké akumulaci lipidů v játrech, ke zvýšené akumulaci dochází i v kosterním svalu. Naopak příjem ω3Cal diety u PPARα-KO myši vedl k benefičním účinkům z hlediska poklesu tělesného tuku a snížené akumulace lipidů v játrech a v menší míře i v kosterním svalu.

5.4 Lipidové metabolity v plasmě

Odběr krve byl prováděn v průběhu pokusu ve třech odlišných metabolických stavech, a to v postprandiálním stavu (tj. v sytém stavu), na konci pokusu při disekci (tj. v postabsorpčním stavu), a dále v rámci IPGTT u zvířat po celonočním hladovění. Ve všech vzorcích plasmy byly změřeny hladiny TAG, cholesterolu a HDL-cholesterolu. V případě cholesterolu bylo odečtením hodnoty obsahu HDL-cholesterolu od hodnoty celkového cholesterolu vypočítáno i množství non-HDL-cholesterolu, značící jeho obsah v částicích LDL, VLDL a v chylomikronech. Výsledky jsou pak shrnuty v Tabulce 13.

Hladiny TAG byly signifikantně ovlivněny podáváním vysokotukové cHF diety u všech tří genotypů v postabsorpčním stavu. Naproti tomu v postprandiálním ani v hladovém stavu nebyl mezi hladinami TAG statisticky významný rozdíl, zvýšené hladiny

byly naměřeny pouze ve skupině PPAR α -KO myši na cHF dietě ve srovnání se zvířaty na Chow dietě po celonočním hladovění. Podávání ω 3Cal diety nemělo obecně vliv na plasmatické hladiny TAG. K signifikantnímu nárůstu cholesterolu vlivem příjmu vysokotukových diet došlo u WT skupiny ve všech stavech, v případě hladovění byly hladiny cholesterolu u myši na ω 3Cal dietě oproti cHF skupině významně sníženy. V rámci hPPAR α genotypu nebyl rozdíl v hladinách cholesterolu tak výrazný, v případě rozdílu mezi zvířaty na cHF vs. Chow dietě se pohyboval na hranici statistické významnosti. PPAR α -KO skupina vykazovala největší rozdíly v metabolismu cholesterolu patrně opět vlivem dysregulace lipidového metabolismu v důsledku delece PPAR α . Ve všech stavech byl však u PPAR α -KO myši patrný vliv ω 3Cal na snížení hladin především celkového cholesterolu, případně non-HDL cholesterolu, ve srovnání se zvířaty na cHF dietě. Významný účinek ω 3Cal diety na metabolismus HDL-cholesterolu nebyl pozorován.

5.5 Metabolická flexibilita

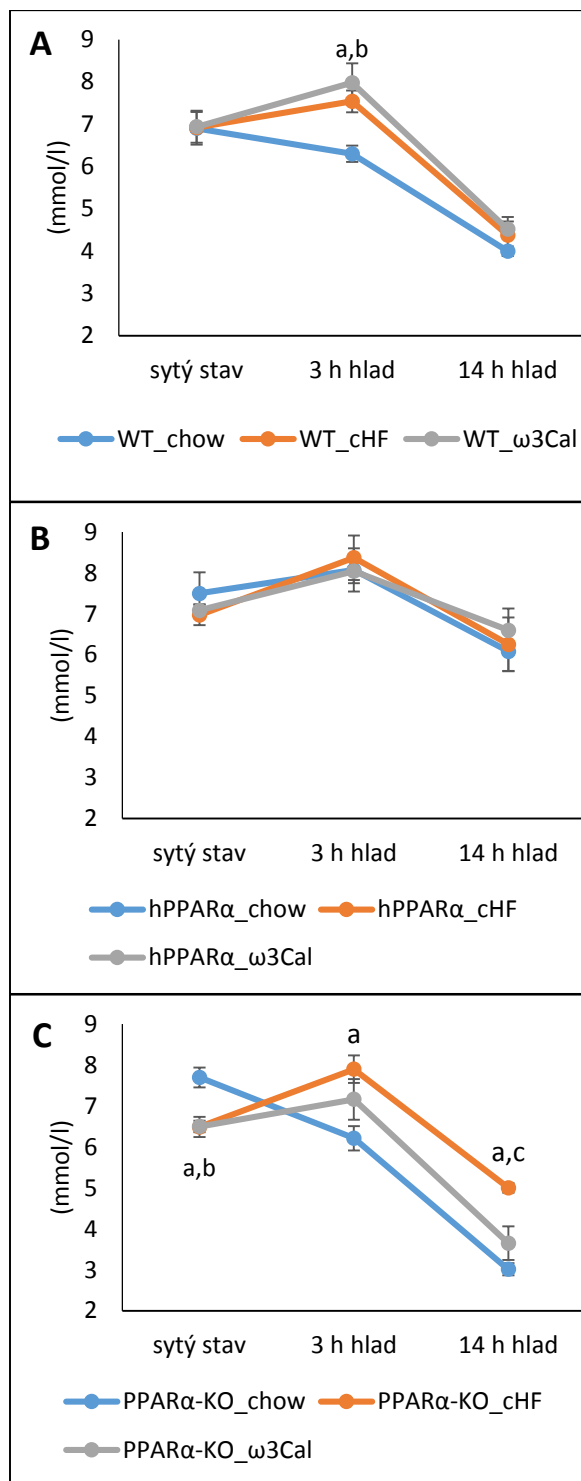
V průběhu experimentu byly u myši navozeny tři odlišné metabolické stavy: postprandiální, postabsorpční (tj. při disekci –hladovění po dobu 3 hodin), a hladový (v rámci IPGTT – celonoční hlad po dobu ~14 hodin). Ve všech případech byla myším změřena glykémie a odebrána krev na izolaci plasmy, ve které byly kromě jiných lipidových metabolitů měřeny i NEFA. Srovnání hladin glykémie a NEFA v různých nutričních stavech organismu může napomoci posouzení tzv. metabolické flexibility, tj. schopnosti organismu reagovat na odlišnou dostupnost energetických substrátů. Z naměřených hodnot byly sestaveny grafy se třemi časovými body, a pro přehlednost byly v grafech jednotlivé skupiny porovnány jak na základě diet, tak podle jednotlivých genotypů (Obrázky 18, 19, 20, 21), výsledné hodnoty jsou shrnuty v Tabulce 10.

Podávání vysokotukové cHF diety ve skupinách WT a PPAR α -KO nevedlo v postabsorpčním stavu ke snížení glykémie jako v případě Chow diety (Obrázek 19-A), ale naopak k mírnému zvýšení (Obrázek 19-B a 19-C). Glukózový metabolismus PPAR α -KO myši reagoval obdobně jako u WT myši, a to především u skupin krmených vysokotukovými dietami (cHF a ω 3Cal), pouze u myši na ω 3Cal dietě byly hodnoty celkově sniženy (Obrázek 19-B). Nejméně flexibilní glukózový metabolismus byl pozorován u hPPAR α myši, u nichž hladiny glykémie v rámci všech stavů oscilují v rozmezí pouze přibližně 2.5 mmol/l (Obrázek 18-B). Nelišily se mezi sebou ani skupiny krmené odlišnými

dietami, naopak metabolická křivka myši na Chow dietě naopak nápadně kopírovala průběh křivky u skupin na vysokotukových dietách (Obrázek 12-A). Po celonočním hladovění byly u hPPAR α myši bez ohledu na typ diety naměřeny nejvyšší hladiny glykémie, které ani po dlouhodobém celonočním hladovění výrazně neklesaly, jako tomu bylo v případě WT a PPAR α -KO myši (Obrázek 19-A).

U myši krmených Chow dietou docházelo se zvyšující se mírou hladovění k postupnému nárůstu hladin NEFA (Obrázek 21-A), naopak u skupin na vysokotukových dietách (cHF a ω 3Cal) došlo v postabsorpčním stavu nejprve k poklesu a až při dlouhodobém hladovění k nárůstu hladin NEFA (Obrázek 21-B a 21-C). Zvýšené hladiny NEFA byly pozorovány u PPAR α -KO zvířat bez ohledu na typ diety. Naopak u WT a hPPAR α skupin byl průběh křivek v sytém a postabsorpčním stavu velmi podobný, po celonočním hladovění však hPPAR α myši obecně vykazovaly nejnižší hladiny NEFA. Celkově u hPPAR α skupiny docházelo k nejnižším oscilacím hladin NEFA v plasmě, a to v rozmezí ~ 0.6 mmol/l (Obrázek 20-B).

Podle očekávání byly hladiny glykémie a NEFA regulovány opačně, při poklesu glykémie došlo k nárůstu hladin NEFA a naopak. Nejnižší metabolickou flexibilitu v tomto směru vykazovala skupina hPPAR α , naopak myši z PPAR α -KO skupiny měly obecně nejvyšší hladiny NEFA ve srovnání se skupinou hPPAR α . Podávání ω 3Cal diety mělo vliv pouze u PPAR α -KO myši, a to na snížení glykémie po celonočním hladovění spolu se zvýšením hladin NEFA (na hranici významnosti – $p = 0.078$).



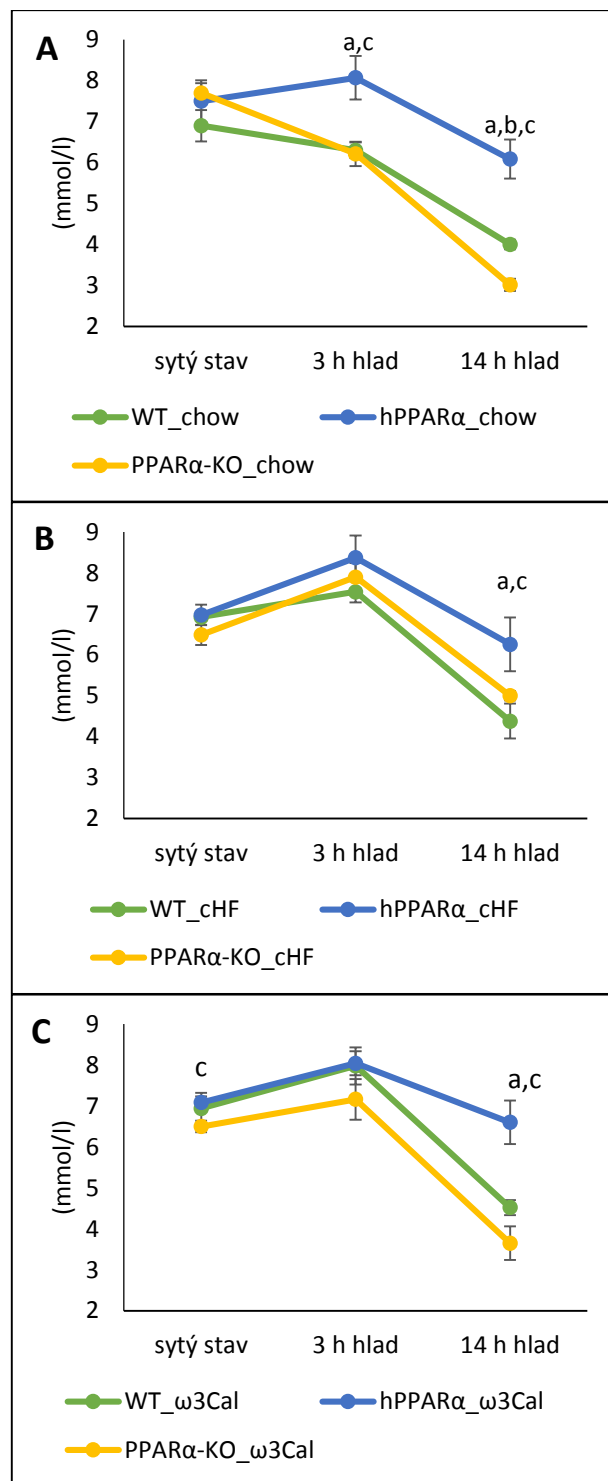
Obrázek 18: Glykémie – porovnání diet

A – WT; B – hPPARα; C – PPARα-KO

^ap≤0.05 pro cHF vs. Chow,

^bp≤0.05 pro ω3Cal vs. Chow,

^cp≤0.05 pro ω3Cal vs. cHF



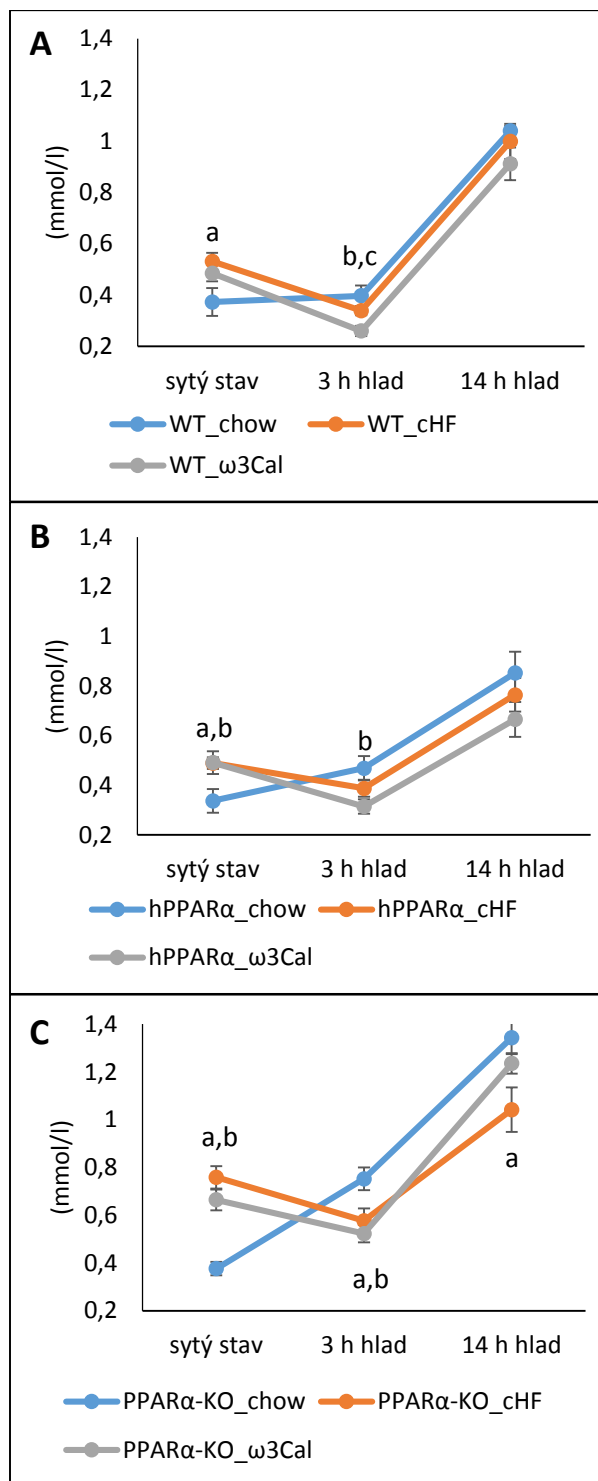
Obrázek 19: Glykémie – porovnání genotypů

A – Chow; B – cHF; C – ω3Cal

^ap≤0.05 pro hPPARα vs. WT,

^bp≤0.05 pro PPARα-KO vs. WT,

^cp≤0.05 pro PPARα-KO vs. hPPARα



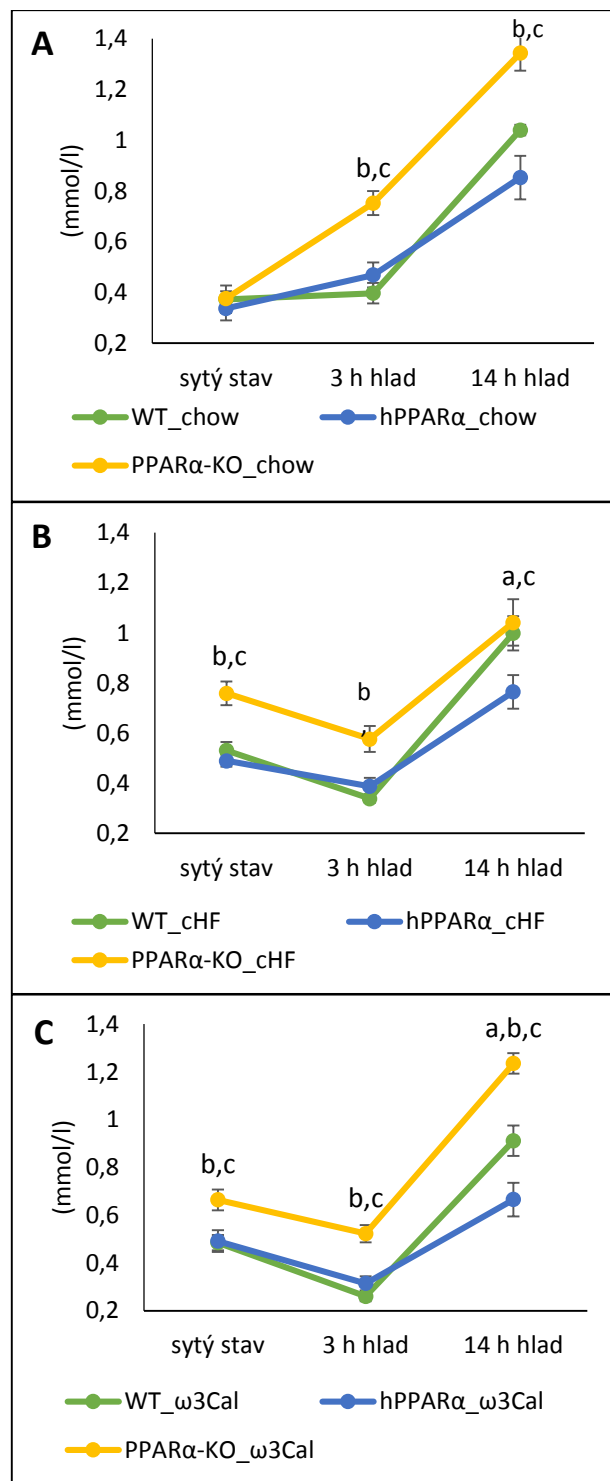
Obrázek 20: Volné MK – porovnání diet

A – WT; B – hPPARα; C – PPARα-KO

^ap<0.05 pro cHF vs. Chow,

^bp<0.05 pro ω3Cal vs. Chow,

^cp<0.05 pro ω3Cal vs. cHF



Obrázek 21: Volné MK – porovnání genotypů

A – Chow; B – cHF; C – ω3Cal

^ap<0.05 pro hPPARα vs. WT,

^bp<0.05 pro PPARα-KO vs. WT,

^cp<0.05 pro PPARα-KO vs. hPPARα

Tabulka 8: Energetická bilance a hmotnost tkání mimo tukových dep

^ap≤0.05 pro cHF vs. Chow, ^bp≤0.05 pro ω3Cal vs. Chow, ^cp≤0.05 pro ω3Cal vs. cHF

	Wild-type			hPPARα			PPARα-KO		
	Chow	cHF	ω3Cal	Chow	cHF	ω3Cal	Chow	cHF	ω3Cal
<i>Energetická bilance</i>									
Tělesná hmotnost – týden 0 (g)	28.20 ± 0.62	27.72 ± 0.85	26.57 ± 1.16	26.91 ± 0.66	26.42 ± 0.69	26.27 ± 0.68	27.16 ± 1.36	26.46 ± 0.74	26.56 ± 0.63
Tělesná hmotnost – týden 6 (g)	29.73 ± 0.98	31.84 ± 1.31	29.91 ± 1.62	28.61 ± 0.90	32.98 ± 2.28	32.12 ± 1.89	28.48 ± 1.54	34.18 ± 1.93 ^a	30.30 ± 0.84
Nárůst tělesné hmotnosti – týden 0-6 (g)	1.53 ± 0.53	4.12 ± 0.47 ^a	3.34 ± 0.69	1.70 ± 0.46	6.56 ± 1.66 ^a	5.86 ± 1.55 ^b	1.32 ± 0.42	7.72 ± 1.59 ^a	3.74 ± 0.69 ^{b,c}
Tělesná hmotnost – disekce (g)	28.99 ± 1.16	31.88 ± 1.33	29.26 ± 1.34	28.05 ± 0.99	32.30 ± 2.69	32.49 ± 2.04	28.59 ± 1.51	35.71 ± 2.14 ^a	30.30 ± 1.06 ^c
Průměrná spotřeba diety (g/myš/den)	4.58 ± 0.05	3.06 ± 0.02 ^a	2.92 ± 0.04 ^{b,c}	4.59 ± 0.06	3.11 ± 0.04 ^a	2.96 ± 0.06 ^b	4.81 ± 0.10	3.04 ± 0.06 ^a	2.98 ± 0.07 ^b
Kumulativní energetická hodnota potravy (MJ/myš) – týden 0-6	3.36 ± 0.11	3.30 ± 0.15	3.05 ± 0.17	3.36 ± 0.08	3.47 ± 0.15	3.23 ± 0.11	3.50 ± 0.08	3.34 ± 0.15	3.16 ± 0.09 ^b
<i>Hmotnost tkání</i>									
BAT (mg)	107 ± 11	108 ± 5	93 ± 8	100 ± 3	115 ± 18	121 ± 21	111 ± 9	181 ± 32	118 ± 10
Srdce (mg)	147 ± 8	152 ± 10	137 ± 7	141 ± 5	147 ± 6	137 ± 6	144 ± 6	152 ± 7	133 ± 4 ^c
Játra (g)	1.17 ± 0.05	1.01 ± 0.05 ^a	1.07 ± 0.07	1.33 ± 0.05	1.08 ± 0.07 ^a	1.11 ± 0.04 ^b	1.21 ± 0.07	1.67 ± 0.16 ^a	1.37 ± 0.12
Sval (mg)	289 ± 12	300 ± 10	271 ± 18	276 ± 15	280 ± 19	267 ± 16	266 ± 11	276 ± 7	257 ± 15

Tabulka 9: Glukózová homeostáza^ap≤0.05 pro cHF vs. Chow, ^bp≤0.05 pro ω3Cal vs. Chow, ^cp≤0.05 pro ω3Cal vs. cHF

	Wild-type			hPPARα			PPARα-KO		
	Chow	cHF	ω3Cal	Chow	cHF	ω3Cal	Chow	cHF	ω3Cal
FBG (mmol/l)	4.00 ± 0.12	4.38 ± 0.43	4.52 ± 0.18	6.09 ± 0.48	6.26 ± 0.66	6.60 ± 0.53	3.01 ± 0.15	4.74 ± 0.28 ^a	3.65 ± 0.41 ^c
tAUC (mol x 180 min)	1.10 ± 0.04	1.61 ± 0.10 ^a	1.43 ± 0.09 ^b	1.51 ± 0.13	1.70 ± 0.20	1.62 ± 0.16	0.91 ± 0.05	1.22 ± 0.06 ^a	0.95 ± 0.15
iAUC (mol x 180 min)	0.38 ± 0.04	0.82 ± 0.06 ^a	0.62 ± 0.10	0.40 ± 0.06	0.46 ± 0.05	0.39 ± 0.11	0.36 ± 0.04	0.41 ± 0.05	0.42 ± 0.08

Tabulka 10: Metabolická flexibilita^ap≤0.05 pro cHF vs. Chow, ^bp≤0.05 pro ω3Cal vs. Chow, ^cp≤0.05 pro ω3Cal vs. cHF

	Wild-type			hPPARα			PPARα-KO		
	Chow	cHF	ω3Cal	Chow	cHF	ω3Cal	Chow	cHF	ω3Cal
glykémie - postprandiální stav (mmol/l)	6.90 ± 0.38	6.92 ± 0.10	6.94 ± 0.38	7.50 ± 0.51	6.79 ± 0.25	7.09 ± 0.15	7.70 ± 0.24	6.49 ± 0.25 ^a	6.50 ± 0.14 ^b
glykémie - disekce (mmol/l)	6.30 ± 0.19	7.54 ± 0.26 ^a	7.98 ± 0.46 ^b	8.07 ± 0.53	8.37 ± 0.54	8.04 ± 0.29	6.21 ± 0.30	7.90 ± 0.34 ^a	7.16 ± 0.50
glykémie - IPGTT (mmol/l)	4.00 ± 0.12	4.38 ± 0.43	4.52 ± 0.18	6.09 ± 0.48	6.26 ± 0.66	6.60 ± 0.53	3.01 ± 0.15	4.74 ± 0.28 ^a	3.65 ± 0.41 ^c
NEFA - postprandiální stav (mmol/l)	0.37 ± 0.05	0.53 ± 0.03 ^a	0.48 ± 0.03	0.34 ± 0.05	0.49 ± 0.02 ^a	0.49 ± 0.05 ^b	0.38 ± 0.03	0.76 ± 0.05 ^a	0.66 ± 0.04 ^b
NEFA - disekce (mmol/l)	0.40 ± 0.04	0.34 ± 0.02	0.26 ± 0.02 ^{b,c}	0.47 ± 0.05	0.39 ± 0.03	0.31 ± 0.03 ^b	0.75 ± 0.05	0.58 ± 0.05 ^a	0.52 ± 0.04 ^b
NEFA - IPGTT (mmol/l)	1.04 ± 0.02	1.00 ± 0.07	0.91 ± 0.06	0.85 ± 0.09	0.76 ± 0.07	0.67 ± 0.07	1.34 ± 0.07	1.04 ± 0.09 ^a	1.24 ± 0.04

Tabulka 11: Hmotnosti tukových dep a index adipozity

gWAT – gonadální tukové depo; dlWAT – dorso-lumbální tukové depo; mWAT – mesenterické tukové depo

^ap≤0.05 pro cHF vs. Chow, ^bp≤0.05 pro ω3Cal vs. Chow, ^cp≤0.05 pro ω3Cal vs. cHF

	Wild-type			hPPARα			PPARα-KO		
	Chow	cHF	ω3Cal	Chow	cHF	ω3Cal	Chow	cHF	ω3Cal
gWAT (g)	0.53 ± 0.13	1.23 ± 0.10 ^a	1.04 ± 0.14 ^b	0.54 ± 0.06	1.37 ± 0.35 ^a	1.39 ± 0.23 ^b	0.49 ± 0.06	1.57 ± 0.16 ^a	0.99 ± 0.10 ^{b,c}
dlWAT (g)	0.25 ± 0.02	0.54 ± 0.03 ^a	0.45 ± 0.02 ^b	0.22 ± 0.02	0.43 ± 0.08 ^a	0.46 ± 0.06 ^b	0.19 ± 0.02	0.52 ± 0.07 ^a	0.34 ± 0.03 ^{b,c}
mWAT (g)	0.31 ± 0.06	0.49 ± 0.02 ^a	0.44 ± 0.04	0.32 ± 0.02	0.60 ± 0.12 ^a	0.63 ± 0.10 ^b	0.30 ± 0.04	0.61 ± 0.09 ^a	0.39 ± 0.04 ^c
Index adipozity (%)	3.71 ± 0.58	7.05 ± 0.22 ^a	6.56 ± 0.33 ^b	3.80 ± 0.20	6.97 ± 1.03 ^a	7.37 ± 0.73 ^b	3.35 ± 0.23	7.42 ± 0.48 ^a	5.61 ± 0.32 ^{b,c}

Tabulka 12: Akumulace lipidů ve tkáních^ap≤0.05 pro cHF vs. Chow, ^bp≤0.05 pro ω3Cal vs. Chow, ^cp≤0.05 pro ω3Cal vs. cHF

	Wild-type			hPPARα			PPARα-KO		
	Chow	cHF	ω3Cal	Chow	cHF	ω3Cal	Chow	cHF	ω3Cal
Játra lipidy (mg/g)	28.74 ± 2.31	61.96 ± 13.24 ^a	77.96 ± 14.99 ^b	20.92 ± 1.28	65.01 ± 16.33 ^a	76.62 ± 9.65 ^b	40.25 ± 2.82	235.04 ± 11.55 ^a	139.87 ± 17.00 ^{b,c}
Sval lipidy (mg/g)	10.76 ± 1.76	20.43 ± 5.97	22.11 ± 5.72	17.33 ± 4.36	16.02 ± 2.11	30.79 ± 7.80	19.26 ± 3.83	43.13 ± 6.22 ^a	30.34 ± 4.40
Srdce lipidy (mg/g)	15.41 ± 0.54	17.38 ± 1.55	17.43 ± 0.71	17.49 ± 0.64	19.11 ± 0.64	18.65 ± 1.11	16.88 ± 0.63	19.94 ± 1.51	19.58 ± 1.26
BAT lipidy (mg/g)	394.6 ± 28.2	401.7 ± 13.7	405.1 ± 18.6	379.3 ± 18.9	366.9 ± 37.3	381.8 ± 37.3	442.5 ± 21.9	463.2 ± 22.2	438.8 ± 28.7

Tabulka 13: Hladiny lipidových metabolitů v plasmě

^ap≤0.05 pro cHF vs. Chow, ^bp≤0.05 pro ω3Cal vs. Chow, ^cp≤0.05 pro ω3Cal vs. cHF; chol – cholesterol

	Wild-type			hPPARα			PPARα-KO		
	Chow	cHF	ω3Cal	Chow	cHF	ω3Cal	Chow	cHF	ω3Cal
<i>Disekce</i>									
TAG (mmol/l)	1.02 ± 0.11	0.68 ± 0.07 ^a	0.60 ± 0.06 ^b	1.56 ± 0.11	0.86 ± 0.14 ^a	0.73 ± 0.13 ^b	1.41 ± 0.13	0.91 ± 0.08 ^a	0.84 ± 0.06 ^b
chol (mmol/l)	2.97 ± 0.14	4.63 ± 0.23 ^a	4.44 ± 0.28 ^b	3.66 ± 0.23	4.49 ± 0.47	4.35 ± 0.21 ^b	2.79 ± 0.23	4.64 ± 0.28 ^a	3.64 ± 0.24 ^{b,c}
HDL-chol (mmol/l)	1.76 ± 0.12	1.93 ± 0.08	2.03 ± 0.05	1.60 ± 0.08	1.86 ± 0.11	1.81 ± 0.05 ^b	1.41 ± 0.06	1.91 ± 0.08 ^a	1.71 ± 0.09 ^b
non-HDL-chol (mmol/l)	1.22 ± 0.12	2.71 ± 0.22 ^a	2.42 ± 0.25 ^b	2.06 ± 0.20	2.68 ± 0.37	2.55 ± 0.18	1.38 ± 0.18	2.73 ± 0.22 ^a	1.94 ± 0.19 ^{b,c}
<i>Postprandiální stav</i>									
TAG (mmol/l)	0.68 ± 0.24	0.55 ± 0.03	0.58 ± 0.02	1.53 ± 0.33	0.91 ± 0.08	0.94 ± 0.21	1.01 ± 0.18	1.00 ± 0.09	0.74 ± 0.09
chol (mmol/l)	3.23 ± 0.07	4.21 ± 0.14 ^a	4.02 ± 0.27 ^b	3.38 ± 0.28	4.72 ± 0.39 ^a	3.81 ± 0.42	2.49 ± 0.20	4.32 ± 0.21 ^a	3.50 ± 0.22 ^{b,c}
HDL-chol (mmol/l)	1.34 ± 0.10	1.58 ± 0.02	1.71 ± 0.03	1.33 ± 0.09	1.38 ± 0.14	1.29 ± 0.12	1.04 ± 0.14	1.36 ± 0.07 ^a	1.29 ± 0.08
non-HDL-chol (mmol/l)	1.89 ± 0.17	2.91 ± 0.08	2.48 ± 0.33	2.03 ± 0.24	3.27 ± 0.33 ^a	2.42 ± 0.43	1.41 ± 0.23	2.97 ± 0.18 ^a	2.42 ± 0.21 ^b
<i>IPGTT</i>									
TAG (mmol/l)	0.60 ± 0.17	0.80 ± 0.10	0.54 ± 0.06	0.64 ± 0.14	0.96 ± 0.14	0.78 ± 0.08	0.55 ± 0.03	0.72 ± 0.05 ^a	0.62 ± 0.04
chol (mmol/l)	3.06 ± 0.10	4.39 ± 0.23 ^a	3.89 ± 0.01 ^{b,c}	3.33 ± 0.33	4.37 ± 0.36	3.73 ± 0.33	2.66 ± 0.30	4.43 ± 0.27 ^a	3.09 ± 0.31 ^c
HDL-chol (mmol/l)	1.87 ± 0.14	1.91 ± 0.19	2.00 ± 0.14	1.81 ± 0.11	1.91 ± 0.26	1.77 ± 0.13	1.36 ± 0.11	1.84 ± 0.09 ^a	1.64 ± 0.09
non-HDL-chol (mmol/l)	1.18 ± 0.18	2.33 ± 0.28 ^a	1.89 ± 0.15 ^b	1.52 ± 0.25	2.46 ± 0.23 ^a	1.96 ± 0.28	1.30 ± 0.25	2.59 ± 0.22 ^a	1.45 ± 0.26 ^c

6. Diskuse

6.1 Genotypizační protokol

Metoda genotypizace byla zásadní pro expanzi nových myší kolonií a obecně pro průběh celého pokusu. Genotypizace myších kmenů patří v naší laboratoři mezi dlouhodobě zavedené metody, hlavním úskalím proto bylo použití vhodných primerů pro genotypickou analýzu DNA pomocí PCR metody. Ukázalo se, že sekvence primerů pro detekci hPPAR α publikované v práci Yang *et al.*, která jako první popisovala konstrukci námi používaného transgenního myšího modelu (Yang *et al.*, 2008), byly chybné (záměna forward a reverse primerů společně s chybným uvedením některých bází). Původně navržené primery pro myší formu PPAR α s délkou produktu ~650 bp byly rovněž nevyhovující, a proto byly v obou případech navrženy nové primery (viz kapitola Metody). Pro primery byl následně zvolen vhodný marker molekulových hmotností podle předpokládané délky PCR produktů, a dále dostatečně dlouhá doba průběhu elektroforézy, aby došlo ke zřetelnému oddělení PCR produktů i proužků markeru (viz Metody). V průběhu expanze myších kolonií pak byly využívány převážně hPPAR α primery pro odlišení genotypů hPPAR α a PPAR α -KO, které bylo možno u potomstva chovných párů detekovat.

6.2 Hmotnostní přírůstek a účinek ω 3Cal

V experimentu jsme použili v naší laboratoři nově zavedený myší kmen 129S1/SvImJ, u kterého dle dostupné literatury (Shockley *et al.*, 2009); (Svenson *et al.*, 2007) dochází při příjmu vysokotukové diety k nárůstu tělesné hmotnosti obdobně jako u kmene C57BL/6J, známého pro svou náchylnost k rozvoji dietou-indukované obezity. Podávání vysokotukových diet CHF a ω 3Cal způsobilo u myší všech genotypů signifikantní zvýšení hmotnostního přírůstku proti kontrolní Chow dietě, pouze u WT myší krmených ω 3Cal dietou byl přírůstek na hranici signifikance ($p = 0.07$). K nárůstu tělesné hmotnosti došlo i přes to, že se kumulativní energetická hodnota přijaté potravy mezi skupinami Chow a CHF významně nelišila. Tento jev lze vysvětlit odlišným složením diet a jeho působením na rozvoj obezity. Naše CHF dieta je založena z velké části na kukuřičném oleji, a právě diety s vysokým obsahem kyseliny linolové (18:2n-6) a olejové (18:1n-9) mají silný

obezogenní účinek (Buettner et al., 2007). Nicméně tento účinek může být ovlivněn suplementací vysokotukové diety pomocí n-3 PUFA koncentrátů. Jako zdroj n-3 PUFA jsme zvolili olej ze zooplanktonu *Calanus finmarchicus* (ω 3Cal) s PUFA navázanými ve formě esterů vosku. Jedná se o prozatím poměrně málo studovanou formu n-3 PUFA, avšak podle dosavadních výzkumů by mohl být ω 3Cal velmi účinný z hlediska zlepšení chronického zánětu, aterosklerózy či inzulínové senzitivity (Eilertsen et al., 2012); (Hoper et al., 2014).

Dle informací dostupných z literatury vysokotuková dieta obohacená o ω 3Cal při dlouhodobém podávání způsobuje u myší snížení tělesné hmotnosti oproti jedincům krmeným běžnou vysokotukovou dietou bez suplementace (Hoper et al., 2013); (Salma et al., 2016). V našem pokusu jsme však signifikantní pokles hmotnostního přírůstku vlivem podávání ω 3Cal pozorovali pouze u PPAR α -KO myší, zatímco u myší genotypu WT a hPPAR α se skupiny krmené CHF a ω 3Cal dietou významně nelišily. Stejný výsledek byl pozorován i co se týče parametru index adipozity, který je dobrým ukazatelem obsahu tuku v organismu (viz Metody). Důvodem by mohlo být použití geneticky odlišných myších kmenů, jelikož v našem pokusu jsme použili různé genetické varianty kmene 129S1/SvImJ, zatímco v práci Hoper *et al.* se jednalo o myši kmene C57BL/6J (Hoper et al., 2013); (Salma et al., 2016), u kterých se podařilo indukovat podstatně vyšší míru hmotnostního přírůstku než v naší současné studii. Tuto úvahu by mohl potvrzovat i fakt, že v naší studii byl významný účinek ω 3Cal diety na snížení hmotnostního přírůstku pozorován pouze u PPAR α -KO myší, které měly ze všech námi studovaných genotypů nejvyšší hmotnostní přírůstek v odpovědi na podání CHF diety. Naopak nižší nárůst tělesné hmotnosti a snížení adipozity po podání ω 3Cal diety mohl být u těchto myší ovlivněn obecně nižším energetickým příjmem, i když rozdíl v příjmu potravy u myší na ω 3Cal a CHF dietě nebyl významný. Nelze ani vyloučit možnost působení zvýšeného energetického výdeje, jelikož jsme rozdíly v bazálním metabolismu experimentálně neověřovali. Dle měření VO_{2max} při fyzické zátěži v experimentu Hoper *et al.* (Hoper et al., 2014) totiž dochází u myší krmených ω 3Cal ke zvýšení aerobní kapacity, která bývá spojována právě se zvýšeným klidovým energetickým výdejem v důsledku zvýšené fyzické aktivity.

6.3 Vliv ω 3Cal na glukózovou homeostázu

Podávání vysokotukové diety u hlodavců je běžně spojeno se zhoršením glukózové tolerance a rozvojem IR (Buettner et al., 2007). Míra glukózové tolerance byla v našem pokusu stanovena pomocí IPGTT. V našem experimentu bylo zvoleno intraperitoneální podání glukózy především z důvodu vyloučení možného odlišného vstřebávání glukózy v trávicím traktu v důsledku rozdílného složení diet. V distálním střevě byla totiž prokázána přítomnost n-3 PUFA receptoru FFAR-4 (Hirasawa et al., 2005), jehož aktivací může dojít ke zvýšenému vstřebávání a utilizaci glukózy translokací glukózového receptoru GLUT4 na buněčnou membránu (Oh et al., 2010).

Podle předpokladu došlo u WT i PPAR α -KO myši krmených cHF oproti Chow dietě ke zvýšení glykémie v postabsorptivním stavu a zhoršení glukózové tolerance, v případě PPAR α -KO došlo navíc i ke zvýšení FBG a snížení flexibility glukózového metabolismu. Naproti tomu u kmene hPPAR α nedocházelo po podání vysokotukových diet (cHF a ω 3Cal) k žádným signifikantním změnám parametrů glukózového metabolismu ve srovnání se zvířaty na Chow dietě. Navzdory signifikantnímu nárůstu adipozity (tělesného tuku) by tak hPPAR α jedinci mohli být rezistentnější k negativním účinkům vysokotukové diety na glukózový metabolismus. Myši hPPAR α krmené Chow dietou ale vykazovaly v různých nutričních stavech takové změny v hladinách glukózy, které by spíše odpovídaly podávání cHF diety, a to i ve srovnání s ostatními genotypy. To naznačuje, že fenotyp myši hPPAR α kmene je odlišný již u kontrolních jedinců krmených Chow dietou a naznačuje obecně sníženou metabolickou flexibilitu hPPAR α kmene. Příjem vysokotukové diety obohacené o ω 3Cal dle Hoper *et al.* vede ke zlepšení glukózové tolerance a snížení hladin inzulínu v plasmě (Hoper et al., 2013). Benefiční efekt ω 3Cal na glukózový metabolismus byl v našem experimentu pozorován pouze u PPAR α -KO myši, u kterých došlo na rozdíl od jejich protějšků krmených cHF dietou ke snížení FBG a dle hodnot tAUC bylo naznačeno i zlepšení glukózové tolerance. Podávání ω 3Cal u myši z WT skupiny nemělo odlišný účinek od cHF diety, neprojevily se tedy žádné benefiční účinky n-3 PUFA suplementace, ale naopak u myši krmených ω 3Cal dietou došlo ke zvýšení FBG a zhoršení glukózové tolerance. Nicméně příznivý účinek ω 3Cal diety u PPAR α -KO myši mohl být též podmíněn nižší tělesnou hmotností těchto zvířat a nelze proto s jistotou určit, zda se jednalo o přímý účinek ω 3Cal na glukózovou homeostázu, či pouze o sekundární vliv sníženého hmotnostního přírůstku.

6.4 Vliv ω 3Cal na lipidový metabolismus

V práci Hoper *et al.* jsou také popisovány benefiční účinky podávání ω 3Cal na lipidový metabolismus a to především v játrech, kde došlo ke snížení úrovně jaterní steatózy (Hoper *et al.*, 2013); (Hoper *et al.*, 2014). V naší studii byla míra jaterní steatózy měřena na základě stanovení obsahu lipidů v játrech. Pozitivní účinek ω 3Cal diety v tomto směru vykazovala pouze skupina PPAR α -KO, u které došlo v odpovědi na suplementaci n-3 PUFA k významnému snížení obsahu lipidů v játrech. V kosterním svalu, tj. ve tkáni, která je důležitá pro clearance glukózy především v postprandiálním stavu, byl pak antisteatotický účinek ω 3Cal diety pouze naznačen. Příjem ω 3Cal dále vedl u PPAR α -KO myši ke snížení hladin celkového cholesterolu, resp. non-HDL cholesterolu v plasmě, jehož zvýšené hladiny jsou průvodním jevem dyslipidemického stavu při obezitě. Stejně jako v případě glukózového metabolismu může být i v tomto případě benefiční účinek ω 3Cal u PPAR α -KO myši důsledkem nižší tělesné hmotnosti. Zdá se, že jaterní PPAR α je aktivovaný především lipidy vznikajícími v rámci jaterní *de novo* syntézy, případně lipidy přijatými stravou, nikoliv ale MK pocházejícími z lipolýzy v tukové tkáni (Chakravarthy *et al.*, 2005). Podávání diety suplementované n-3 PUFA tak může být vhodným způsobem, jak zvýšit aktivitu PPAR α v játrech. V kontrastu s tím ale příjem ω 3Cal diety u myši ve skupině WT a hPPAR α neměl výrazný benefiční účinek na lipidový metabolismus v játrech, ani na celotělové úrovni. Pro osvětlení působení ω 3Cal diety u myši v rámci jednotlivých genotypů bude zapotřebí ještě analyzovat genovou expresi klíčových enzymů účastnících se glukózového a lipidového metabolismu, včetně samotného PPAR α .

Absence významných účinků ω 3Cal diety u WT a hPPAR α myši ve srovnání s benefičními účinky popisovanými v literatuře [např. (Hoper *et al.*, 2013); (Salma *et al.*, 2016)] může mít více důvodů. Jedním je již výše zmíněné použití myšího kmene 129S1/SvImJ na rozdíl od studie autorů Hoper *et al.*, kteří použili myši kmene C57BL/6J (Hoper *et al.*, 2013); (Salma *et al.*, 2016). Dalším podstatným rozdílem by mohlo být i použití odlišné vysokotukové diety. Hlavní tukovou složkou naší vysokotukové CHF diety byl kukuřičný olej s vysokým obsahem n-6 PUFA, především kyseliny linolové (18:2n-6), kdežto Hoper *et al.* využívali pro své pokusy vysokotukovou dietu na bázi sádla s vyšším podílem nasycených MK (Hoper *et al.*, 2014). Nasycené MK vykazují poměrně nízkou afinitu k myšimu receptoru PPAR α (Oswal *et al.*, 2013). Nicméně PPAR α má poměrně nízkou specifitu, např. kyselina linolová je svým účinkem na genovou expresi regulovanou přes PPAR α srovnatelná s EPA (Sanderson *et al.*, 2008). Kyselina linolová není

tak potentním agonistou jako DHA či ALA, přesto její vliv na PPAR α v rámci působení samotné cHF diety nebude zanedbatelný. Je proto pochopitelné, že účinek ω 3Cal na pozadí vysokotukové diety založené na sádle s obsahem nasycených MK, které jen málo stimulují PPAR α , tak bude výraznější než v případě naší cHF diety. Je ale zajímavé, že lidská forma PPAR α (tj. hPPAR α) má na rozdíl od myšího PPAR α zvýšenou afinitu pro nasycené MK (Oswal et al., 2013), což pravděpodobně ovlivní i porovnání účinků ω 3Cal diety mezi WT a hPPAR α zvířaty krmenými různými typy vysokotukových diet. Pokud uvažujeme o příznivém vlivu ω 3Cal na metabolismus PPAR α -KO myši, je třeba vzít v potaz vyšší míru obezity a metabolických poruch indukovaných podáváním cHF diety u těchto zvířat. Je pravděpodobné, že příznivý vlivu podávání ω 3Cal diety se může uplatnit především v případech, kdy je indukována dostatečná úroveň obezity a metabolického postižení, což nebyl případ WT a hPPAR α myši. Nicméně objasnění benefičního působení ω 3Cal na metabolismus PPAR α -KO myši vyžaduje další studium, především s ohledem na možné působení lehce sníženého příjmu potravy pozorovaného u této skupiny zvířat. Dalším možným experimentálním přístupem by mohlo být podávání ω 3Cal v rámci tzv. reverze, tj. podávání ω 3Cal až po rozvinutí obezity indukované normální vysokotukovou cHF dietou bez n-3 PUFA suplementace, což více odpovídá klinické praxi.

7. Závěr

Podáváním vysokotukové CHF diety byl u nově zavedených myších linií (s výjimkou PPAR α -KO myši) na genetickém pozadí kmene 129S1/SvImJ indukován relativně nízký hmotnostní přírůstek a nárůst hmotnosti tukových dep, i když akumulace lipidů v játrech byla zřetelně zvýšená ve srovnání s příslušnými kontrolami na Chow dietě. U myši WT a PPAR α -KO byla podáváním vysokotukové diety zhoršená i glukózová tolerance. Naopak v případě hPPAR α myši byla zjištěna stejná míra glukózové tolerance bez ohledu na typ podávané diety a obecně narušení metabolické flexibility s ohledem na regulaci glykémie nutričním stavem. Podávání ω 3Cal diety nevedlo u WT a hPPAR α myši k významným benefičním účinkům. Naopak u PPAR α -KO myši s úplnou absencí PPAR α došlo podáváním ω 3Cal diety k částečné normalizaci FBG, hladin cholesterolu i non-HDL cholesterolu v plasmě, a dále k významnému snížení akumulace lipidů v játrech. Současně byl u PPAR α -KO myši krmených ω 3Cal dietou pozorován nižší hmotnostní přírůstek spojený s nižší akumulací tělesného tuku, což může částečně vysvětlit metabolické účinky ω 3Cal u těchto zvířat. Vzhledem k významnému vlivu ω 3Cal na akumulaci tělesného tuku a metabolismus u PPAR α -KO myši je třeba dále analyzovat alternativní mechanismy účinku (tj. nezávislé na PPAR α) této formy n-3 PUFA.

8. Seznam použité literatury

- ADAMS, V., HEIKER, J. T., HOLLRIEGEL, R., BECK, E. B., WOITEK, F. J., ERBS, S., BLUHER, M., STUMVOLL, M., BECK-SICKINGER, A. G., SCHULER, G. & LINKE, A. 2013. Adiponectin promotes the migration of circulating angiogenic cells through p38-mediated induction of the CXCR4 receptor. *International Journal of Cardiology*, 167, 2039-2046.
- ADER, M., STEFANOVSKI, D., KIM, S. P., RICHEY, J. M., IONUT, V., CATALANO, K. J., HUCKING, K., ELLMERER, M., VAN CITTERS, G., HSU, I. R., CHIU, J. D., WOOLCOTT, O. O., HARRISON, L. N., ZHENG, D., LOTTATI, M., KOLKA, C. M., MOORADIAN, V., DITTMANN, J., YAE, S., LIU, H. W., CASTRO, A. V. B., KABIR, M. & BERGMAN, R. N. 2014. Hepatic Insulin Clearance Is the Primary Determinant of Insulin Sensitivity in the Normal Dog. *Obesity*, 22, 1238-1245.
- AL-KHALILI, L., BOUZAKRI, K., GLUND, S., LONNQVIST, F., KOISTINEN, H. A. & KROOK, A. 2006. Signaling specificity of interleukin-6 action on glucose and lipid metabolism in skeletal muscle. *Molecular Endocrinology*, 20, 3364-3375.
- ALBRECHT, P. P., TORSELL, N. E., KRISHNAN, P., EHRESMAN, D. J., FRAME, S. R., CHANG, S. C., BUTENHOFF, J. L., KENNEDY, G. L., GONZALEZ, F. J. & PETERS, J. M. 2013. A Species Difference in the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor -Dependent Response to the Developmental Effects of Perfluorooctanoic Acid. *Toxicological Sciences*, 131, 568-582.
- ARNER, P. 1999. Catecholamine-induced lipolysis in obesity. *International Journal of Obesity*, 23, 10-13.
- ARTERBURN, L. M., HALL, E. B. & OKEN, H. 2006. Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83, 1467S-1476S.
- ASTERHOLM, I. W., TAO, C., MORLEY, T. S., WANG, Q. A., DELGADO-LOPEZ, F., WANG, Z. V. & SCHERER, P. E. 2014. Adipocyte Inflammation Is Essential for Healthy Adipose Tissue Expansion and Remodeling. *Cell Metabolism*, 20, 103-118.
- BACKES, J., ANZALONE, D., HILLEMANN, D. & CATINI, J. 2016. The clinical relevance of omega-3 fatty acids in the management of hypertriglyceridemia. *Lipids in Health and Disease*, 15.
- BAGNATI, M., OGUNKOLADE, B. W., MARSHALL, C., TUCCI, C., HANNA, K., JONES, T. A., BUGLIANI, M., NEDJAI, B., CATON, P. W., KIESWICH, J., YAQOOB, M. M., BALL, G. R., MARCHETTI, P., HITMAN, G. A. & TURNER, M. D. 2016. Glucolipotoxicity initiates pancreatic beta-cell death through TNFR5/CD40-mediated STAT1 and NF-kappa B activation. *Cell Death & Disease*, 7.
- BALLAND, E. & COWLEY, M. A. 2015. New insights in leptin resistance mechanisms in mice. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 39, 59-65.
- BOURLIER, V., ZAKAROFF-GIRARD, A., MIRANVILLE, A., DE BARROS, S., MAUMUS, M., SENGES, C., GALITZKY, J., LAFONTAN, M., KARPE, F., FRAYN, K. N. & BOULOUMIE, A. 2008. Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages. *Circulation*, 117, 806-815.

- BUCKLEY, C. D., GILROY, D. W. & SERHAN, C. N. 2014. Proresolving Lipid Mediators and Mechanisms in the Resolution of Acute Inflammation. *Immunity*, 40, 315-327.
- BUETTNER, R., SCHOLMERICH, J. & BOLLHEIMER, L. C. 2007. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)*, 15, 798-808.
- CAMPBELL, F. M., KOZAK, R., WAGNER, A., ALTAREJOS, J. Y., DYCK, J. R. B., BELKE, D. D., SEVERSON, D. L., KELLY, D. P. & LOPASCHUK, G. D. 2002. A role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) in the control of cardiac malonyl-CoA levels - Reduced fatty acid oxidation rates and increased glucose oxidation rates in the hearts of mice lacking PPAR alpha are associated with higher concentrations of malonyl-CoA and reduced expression of malonyl-CoA decarboxylase. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 4098-4103.
- CAMPOREZ, J. P. G., KANDA, S., PETERSEN, M. C., JORNAYVAZ, F. R., SAMUEL, V. T., BHANOT, S., PETERSEN, K. F., JURCZAK, M. J. & SHULMAN, G. I. 2015. ApoA5 knockdown improves whole-body insulin sensitivity in high-fat-fed mice by reducing ectopic lipid content. *Journal of Lipid Research*, 56, 526-536.
- CAMPOS, C. 2012. Chronic Hyperglycemia and Glucose Toxicity: Pathology and Clinical Sequelae. *Postgraduate Medicine*, 124, 90-97.
- CAREY, A. L., BRUCE, C. R., SACCHETTI, M., ANDERSON, M. J., OLSEN, D. B., SALTIN, B., HAWLEY, J. A. & FEBBRAIO, M. A. 2004. Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha are not increased in patients with Type 2 diabetes: evidence that plasma interleukin-6 is related to fat mass and not insulin responsiveness. *Diabetologia*, 47, 1029-1037.
- CAREY, A. L., STEINBERG, G. R., MACAULAY, S. L., THOMAS, W. G., HOLMES, A. G., RAMM, G., PRELOVSEK, O., HOHNEN-BEHRENS, C., WATT, M. J., JAMES, D. E., KEMP, B. E., PEDERSEN, B. K. & FEBBRAIO, M. A. 2006. Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. *Diabetes*, 55, 2688-2697.
- CASTRO, A. V., KOLKA, C. M., KIM, S. P. & BERGMAN, R. N. 2014. Obesity, insulin resistance and comorbidities? Mechanisms of association. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 58, 600-9.
- CATTLEY, R. C., DELUCA, J., ELCOMBE, C., FENNER-CRISP, P., LAKE, B. G., MARSMAN, D. S., PASTOOR, T. A., POPP, J. A., ROBINSON, D. E., SCHWETZ, B., TUGWOOD, J. & WAHLI, W. 1998. Do peroxisome proliferating compounds pose a hepatocarcinogenic hazard to humans? *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 27, 47-60.
- CHAKRAVARTHY, M. V., LODHI, I. J., YIN, L., MALAPAKA, R. R. V., XU, H. E., TURK, J. & SEMENKOVICH, C. F. 2009. Identification of a Physiologically Relevant Endogenous Ligand for PPAR alpha in Liver. *Cell*, 138, 476-488.
- CHAKRAVARTHY, M. V., PAN, Z. J., ZHU, Y. M., TORDJMAN, K., SCHNEIDER, J. G., COLEMAN, T., TURK, J. & SEMENKOVICH, C. F. 2005. "New" hepatic fat activates PPAR alpha to maintain glucose, lipid, and cholesterol homeostasis. *Cell Metabolism*, 1, 309-322.
- CHEN, J., HE, X. Z. & HUANG, J. H. 2014. Diet Effects in Gut Microbiome and Obesity. *Journal of Food Science*, 79, R442-R451.
- CHEUNG, C., AKIYAMA, T. E., WARD, J. M., NICOL, C. J., FEIGENBAUM, L., VINSON, C. & GONZALEZ, F. J. 2004. Diminished hepatocellular proliferation in

- mice humanized for the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Cancer Research*, 64, 3849-3854.
- COOK, C. M., LARSEN, T. S., DERRIG, L. D., KELLY, K. M. & TANDE, K. S. 2016. Wax Ester Rich Oil From The Marine Crustacean, *Calanus finmarchicus*, is a Bioavailable Source of EPA and DHA for Human Consumption. *Lipids*, 51, 1137-44.
- DE CASTRO, G. S. & CALDER, P. C. 2017. Non-alcoholic fatty liver disease and its treatment with n-3 polyunsaturated fatty acids. *Clin Nutr*.
- DECKELBAUM, R. J., WORGALL, T. S. & SEO, T. 2006. n-3 fatty acids and gene expression. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83, 1520S-1525S.
- DENTIN, R., BENHAMED, F., PEGORIER, J. P., FOUFELLE, F., VIOLLET, B., VAULONT, S., GIRARD, J. & POSTIC, C. 2005. Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *Journal of Clinical Investigation*, 115, 2843-2854.
- DONATH, M. Y., DALMAS, E., SAUTER, N. S. & BONI-SCHNETZLER, M. 2013. Inflammation in Obesity and Diabetes: Islet Dysfunction and Therapeutic Opportunity. *Cell Metabolism*, 17, 860-872.
- DONNELLY, K. L., SMITH, C. I., SCHWARZENBERG, S. J., JESSURUN, J., BOLDT, M. D. & PARKS, E. J. 2005. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Clinical Investigation*, 115, 1343-1351.
- EILERTSEN, K. E., MAEHRE, H. K., JENSEN, I. J., DEVOLD, H., OLSEN, J. O., LIE, R. K., BROX, J., BERG, V., ELVEVOLL, E. O. & OSTERUD, B. 2012. A Wax Ester and Astaxanthin-Rich Extract from the Marine Copepod *Calanus finmarchicus* Attenuates Atherogenesis in Female Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Journal of Nutrition*, 142, 508-512.
- EISSING, L., SCHERER, T., TODTER, K., KNIPPSCHILD, U., GREVE, J. W., BUURMAN, W. A., PINNSCHMIDT, H. O., RENSEN, S. S., WOLF, A. M., BARTELT, A., HEEREN, J., BUETTNER, C. & SCHEJA, L. 2013. De novo lipogenesis in human fat and liver is linked to ChREBP-beta and metabolic health. *Nature Communications*, 4.
- ERTUNC, M. E., SIKKELAND, J., FENAROLI, F., GRIFFITHS, G., DANIELS, M. P., CAO, H. M., SAATCIOGLU, F. & HOTAMISLIGIL, G. S. 2015. Secretion of fatty acid binding protein aP2 from adipocytes through a nonclassical pathway in response to adipocyte lipase activity. *Journal of Lipid Research*, 56, 423-434.
- FANTUZZI, G. 2013. Adiponectin in inflammatory and immune-mediated diseases. *Cytokine*, 64, 1-10.
- FEBBRAIO, M. A. 2014. Role of interleukins in obesity: implications for metabolic disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 25, 312-319.
- FEIGE, J. N., GELMAN, L., MICHALIK, L., DESVERGNE, B. & WAHLI, W. 2006. From molecular action to physiological outputs: Peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Progress in Lipid Research*, 45, 120-159.
- FERRE, P. & FOUFELLE, F. 2010. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes Obesity & Metabolism*, 12, 83-92.
- FINCK, B. N., LEHMAN, J. J., LEONE, T. C., WELCH, M. J., BENNETT, M. J., KOVACS, A., HAN, X. L., GROSS, R. W., KOZAK, R., LOPASCHUK, G. D. & KELLY, D. P. 2002. The cardiac phenotype induced by PPAR alpha overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *Journal of Clinical Investigation*, 109, 121-130.

- FISCHER, C. P. 2006. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exercise Immunology Review*, 12, 6-33.
- FLACHS, P., ROSSMEISL, M., BRYHN, M. & KOPECKY, J. 2009. Cellular and molecular effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on adipose tissue biology and metabolism. *Clinical Science*, 116, 1-16.
- FOX, T. E., HOUCK, K. L., O'NEILL, S. M., NAGARAJAN, M., STOVER, T. C., POMIANOWSKI, P. T., UNAL, O., YUN, J. K., NAIDES, S. J. & KESTER, M. 2007. Ceramide recruits and activates protein kinase C zeta (PKC zeta) within structured membrane microdomains. *J Biol Chem*, 282, 12450-7.
- GERICKE, M., WEYER, U., BRAUNE, J., BECHMANN, I. & EILERS, J. 2015. A method for long-term live imaging of tissue macrophages in adipose tissue explants. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 308, E1023-E1033.
- GERVOIS, P. & MANSOURI, R. M. 2012. PPAR alpha as a therapeutic target in inflammation-associated diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 16, 1113-1125.
- GIROUSSE, A., TAVERNIER, G., VALLE, C., MORO, C., MEJHERT, N., DINEL, A. L., HOUSIER, M., ROUSSEL, B., BESSE-PATIN, A., COMBES, M., MIR, L., MONBRUN, L., BEZAIRE, V., PRUNET-MARCASSUS, B., WAGET, A., VILA, I., CASPAR-BAUGUIL, S., LOUCHE, K., MARQUES, M. A., MAIRAL, A., RENOUD, M. L., GALITZKY, J., HOLM, C., MOUISEL, E., THALAMAS, C., VIGUERIE, N., SULPICE, T., BURCELIN, R., ARNER, P. & LANGIN, D. 2013. Partial Inhibition of Adipose Tissue Lipolysis Improves Glucose Metabolism and Insulin Sensitivity Without Alteration of Fat Mass. *Plos Biology*, 11.
- HAN, J. & KAUFMAN, R. J. 2016. Thematic Review Series: Lipotoxicity: Many Roads to Cell Dysfunction and Cell Death The role of ER stress in lipid metabolism and lipotoxicity. *Journal of Lipid Research*, 57, 1329-1338.
- HASHIMOTO, T., COOK, W. S., QI, C., YELDANDI, A. V., REDDY, J. K. & RAO, M. S. 2000. Defect in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in response to fasting. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 28918-28928.
- HILL, N. R., LEVY, J. C. & MATTHEWS, D. R. 2013. Expansion of the Homeostasis Model Assessment of beta-Cell Function and Insulin Resistance to Enable Clinical Trial Outcome Modeling Through the Interactive Adjustment of Physiology and Treatment Effects: iHOMA2. *Diabetes Care*, 36, 2324-2330.
- HIRASAWA, A., TSUMAYA, K., AWAJI, T., KATSUMA, S., ADACHI, T., YAMADA, M., SUGIMOTO, Y., MIYAZAKI, S. & TSUJIMOTO, G. 2005. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nature Medicine*, 11, 90-94.
- HOGH, K. L. N., UY, C. E., ASADI, A., BAKER, R. K., RIEDEL, M. J. & GRAY, S. L. 2013. Overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in pancreatic beta-cells improves glucose tolerance in diet-induced obese mice. *Experimental Physiology*, 98, 564-575.
- HOLT, R. I. G. 2005. International Diabetes Federation re-defines the metabolic syndrome. *Diabetes Obesity & Metabolism*, 7, 618-618.
- HOPER, A. C., SALMA, W., KHALID, A. M., HAFSTAD, A. D., SOLLIE, S. J., RAA, J., LARSEN, T. S. & AASUM, E. 2013. Oil from the marine zooplankton *Calanus finmarchicus* improves the cardiometabolic phenotype of diet-induced obese mice. *Br J Nutr*, 110, 2186-93.

- HOPER, A. C., SALMA, W., SOLLIE, S. J., HAFSTAD, A. D., LUND, J., KHALID, A. M., RAA, J., AASUM, E. & LARSEN, T. S. 2014. Wax Esters from the Marine Copepod *Calanus finmarchicus* Reduce Diet-Induced Obesity and Obesity-Related Metabolic Disorders in Mice. *Journal of Nutrition*, 144, 164-169.
- HOWELL, G., DENG, X., YELLATURU, C., PARK, E. A., WILCOX, H. G., RAGHOW, R. & ELAM, M. B. 2009. N-3 polyunsaturated fatty acids suppress insulin-induced SREBP-1c transcription via reduced trans-activating capacity of LXR alpha. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791, 1190-1196.
- HUE, L. & TAEGTMEYER, H. 2009. The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297, E578-91.
- IMAMURA, F., MUKAMAL, K. J., MEIGS, J. B., LUCHSINGER, J. A., IX, J. H., SISCOVICK, D. S. & MOZAFFARIAN, D. 2013. Risk Factors for Type 2 Diabetes Mellitus Preceded by beta-Cell Dysfunction, Insulin Resistance, or Both in Older Adults. *American Journal of Epidemiology*, 177, 1418-1429.
- ISSEMAN, I. & GREEN, S. 1990. ACTIVATION OF A MEMBER OF THE STEROID-HORMONE RECEPTOR SUPERFAMILY BY PEROXISOME PROLIFERATORS. *Nature*, 347, 645-650.
- ITOH, M., KATO, H., SUGANAMI, T., KONUMA, K., MARUMOTO, Y., TERA, S., SAKUGAWA, H., KANAI, S., HAMAGUCHI, M., FUKAISHI, T., AOE, S., AKIYOSHI, K., KOMOHARA, Y., TAKEYA, M., SAKAIDA, I. & OGAWA, Y. 2013. Hepatic Crown-Like Structure: A Unique Histological Feature in Non-Alcoholic Steatohepatitis in Mice and Humans. *Plos One*, 8.
- JEPPESEN, C., SCHILLER, K. & SCHULZE, M. B. 2013. Omega-3 and Omega-6 Fatty Acids and Type 2 Diabetes. *Current Diabetes Reports*, 13, 279-288.
- JOIS, T., HOWARD, V., YOUNGS, K., COWLEY, M. A. & SLEEMAN, M. W. 2016. Dietary Macronutrient Composition Directs ChREBP Isoform Expression and Glucose Metabolism in Mice. *PLoS One*, 11.
- KERSTEN, S. 2014. Integrated physiology and systems biology of PPAR alpha. *Molecular Metabolism*, 3, 354-371.
- KERSTEN, S., SEYDOUX, J., PETERS, J. M., GONZALEZ, F. J., DESVERGNE, B. & WRAHLI, W. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *Journal of Clinical Investigation*, 103, 1489-1498.
- KHAN, I. M., PERRARD, X. Y. D., BRUNNER, G., LUI, H., SPARKS, L. M., SMITH, S. R., WANG, X., SHI, Z. Z., LEWIS, D. E., WU, H. & BALLANTYNE, C. M. 2015. Intermuscular and perimuscular fat expansion in obesity correlates with skeletal muscle T cell and macrophage infiltration and insulin resistance. *International Journal of Obesity*, 39, 1607-1618.
- KOLEKTIV 2016. Zdravotnická ročenka České republiky 2015. Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. ISSN 1210-9991
- KURSAWE, R., CAPRIO, S., GIANNINI, C., NARAYAN, D., LIN, A. P., D'ADAMO, E., SHAW, M., PIERPONT, B., CUSHMAN, S. W. & SHULMAN, G. I. 2013. Decreased Transcription of ChREBP-alpha/beta Isoforms in Abdominal Subcutaneous Adipose Tissue of Obese Adolescents With Prediabetes or Early Type 2 Diabetes Associations With Insulin Resistance and Hyperglycemia. *Diabetes*, 62, 837-844.
- LEE, S. S. T., PINEAU, T., DRAGO, J., LEE, E. J., OWENS, J. W., KROETZ, D. L., FERNANDEZSALGUERO, P. M., WESTPHAL, H. & GONZALEZ, F. J. 1995. TARGETED DISRUPTION OF THE ALPHA-ISOFORM OF THE PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR GENE IN MICE

- RESULTS IN ABOLISHMENT OF THE PLEIOTROPIC EFFECTS OF PEROXISOME PROLIFERATORS. *Molecular and Cellular Biology*, 15, 3012-3022.
- LEE, W. J., KIM, M., PARK, H. S., KIM, H. S., JEON, M. J., OH, K. S., KOH, E. H., WON, J. C., KIM, M. S., OH, G. T., YOON, M., LEE, K. U. & PARK, J. Y. 2006. AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPAR alpha and PGC-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340, 291-295.
- LEE, Y. S., LI, P. P., HUH, J. Y., HWANG, I. J., LU, M., KIM, J. I., HAM, M., TALUKDAR, S., CHEN, A., LU, W. J., BANDYOPADHYAY, G. K., SCHWENDENER, R., OLEFSKY, J. & KIM, J. B. 2011. Inflammation Is Necessary for Long-Term but Not Short-Term High-Fat Diet Induced Insulin Resistance. *Diabetes*, 60, 2474-2483.
- LEMBERGER, T., SALADIN, R., VAZQUEZ, M., ASSIMACOPOULOS, F., STAELS, B., DESVERGNE, B., WAHLI, W. & AUWERX, J. 1996. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene is stimulated by stress and follows a diurnal rhythm. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 1764-1769.
- LEONE, T. C., WEINHEIMER, C. J. & KELLY, D. P. 1999. A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) in the cellular fasting response: The PPAR alpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 7473-7478.
- LIU, H. X., HU, Y., FRENCH, S. W., GONZALEZ, F. J. & WAN, Y. J. Y. 2015. Forced expression of fibroblast growth factor 21 reverses the sustained impairment of liver regeneration in hPPAR alpha(PAC) mice due to dysregulated bile acid synthesis. *Oncotarget*, 6, 9686-9700.
- MAKOWSKI, L., NOLAND, R. C., KOVES, T. R., XING, W. B., ILKAYEVA, O. R., MUEHLBAUER, M. J., STEVENS, R. D. & MUOIO, D. M. 2009. Metabolic profiling of PPAR alpha(-/-) mice reveals defects in carnitine and amino acid homeostasis that are partially reversed by oral carnitine supplementation. *Faseb Journal*, 23, 586-604.
- MANCINI, A. D. & POITOUT, V. 2013. The fatty acid receptor FFA1/GPR40 a decade later: how much do we know? *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 24, 398-407.
- MANSOURI, R. M., BAUGE, E., STAELS, B. & GERVOIS, P. 2008. Systemic and distal repercussions of liver-specific peroxisome proliferator-activated receptor-alpha control of the acute-phase response. *Endocrinology*, 149, 3215-3223.
- MARGETIC, S., GAZZOLA, C., PEGG, G. G. & HILL, R. A. 2002. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 26, 1407-33.
- MASSARO, M., HABIB, A., LUBRANO, L., DEL TURCO, S., LAZZERINI, G., BOURCIER, T., WEKSLER, B. B. & DE CATERINA, R. 2006. The omega-3 fatty acid docosahexaenoate attenuates endothelial cyclooxygenase-2 induction through both NADP(H) oxidase and PKC epsilon inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 15184-15189.
- MASSIERA, F., SAINT-MARC, P., SEYDOUX, J., MURATA, T., KOBAYASHI, T., NARUMIYA, S., GUESNET, P., AMRI, E. Z., NEGREL, R. & AILHAUD, G. 2003. Arachidonic acid and prostacyclin signaling promote adipose tissue development: a human health concern? *Journal of Lipid Research*, 44, 271-279.
- MATTHEWS, D. R., HOSKER, J. P., RUDENSKI, A. S., NAYLOR, B. A., TREACHER, D. F. & TURNER, R. C. 1985. HOMEOSTASIS MODEL ASSESSMENT -

- INSULIN RESISTANCE AND BETA-CELL FUNCTION FROM FASTING PLASMA-GLUCOSE AND INSULIN CONCENTRATIONS IN MAN. *Diabetologia*, 28, 412-419.
- MCQUAID, S. E., HODSON, L., NEVILLE, M. J., DENNIS, A. L., CHEESEMAN, J., HUMPHREYS, S. M., RUGE, T., GILBERT, M., FIELDING, B. A., FRAYN, K. N. & KARPE, F. 2011. Downregulation of Adipose Tissue Fatty Acid Trafficking in Obesity A Driver for Ectopic Fat Deposition? *Diabetes*, 60, 47-55.
- MEDINA-GOMEZ, G. 2012. Mitochondria and endocrine function of adipose tissue. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 26, 791-804.
- MIELE, L., GIORGIO, V., ALBERELLI, M. A., DE CANDIA, E., GASBARRINI, A. & GRIECO, A. 2015. Impact of Gut Microbiota on Obesity, Diabetes, and Cardiovascular Disease Risk. *Current Cardiology Reports*, 17.
- MORIGNY, P., HOUSIER, M., MOUISEL, E. & LANGIN, D. 2016. Adipocyte lipolysis and insulin resistance. *Biochimie*, 125, 259-266.
- MOZAFFARIAN, D. & WU, J. H. Y. 2011. Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease Effects on Risk Factors, Molecular Pathways, and Clinical Events. *Journal of the American College of Cardiology*, 58, 2047-2067.
- NGUYEN, M. T. A., SATOH, H., FAVELYUKIS, S., BABENDURE, J. L., IMAMURA, T., SBODIO, J. I., ZALEVSKY, J., DAHIYAT, B. I., CHI, N. W. & OLEFSKY, J. M. 2005. JNK and tumor necrosis factor-alpha mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 35361-35371.
- NOBILI, V., CARPINO, G., ALISI, A., DE VITO, R., FRANCHITTO, A., ALPINI, G., ONORI, P. & GAUDIO, E. 2014. Role of Docosahexaenoic Acid Treatment in Improving Liver Histology in Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Plos One*, 9.
- NOVIKOVA, D. S., GARABADZHIU, A. V., MELINO, G., BARLEV, N. A. & TRIBULOVICH, V. G. 2015. AMP-activated protein kinase: structure, function, and role in pathological processes. *Biochemistry (Mosc)*, 80, 127-44.
- OH, D. Y., TALUKDAR, S., BAE, E. J., IMAMURA, T., MORINAGA, H., FAN, W. Q., LI, P. P., LU, W. J., WATKINS, S. M. & OLEFSKY, J. M. 2010. GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. *Cell*, 142, 687-698.
- OSWAL, D. P., BALANARASIMHA, M., LOYER, J. K., BEDI, S., SOMAN, F. L., RIDER, S. D. & HOSTETLER, H. A. 2013. Divergence between human and murine peroxisome proliferator-activated receptor alpha ligand specificities. *Journal of Lipid Research*, 54, 2354-2365.
- OUCHI, N., KIHARA, S., ARITA, Y., MAEDA, K., KURIYAMA, H., OKAMOTO, Y., HOTTA, K., NISHIDA, M., TAKAHASHI, M., NAKAMURA, T., YAMASHITA, S., FUNAHASHI, T. & MATSUZAWA, Y. 1999. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation*, 100, 2473-6.
- PAERREGAARD, S. I., AGERHOLM, M., SERUP, A. K., MA, T., KIENS, B., MADSEN, L., KRISTIANSEN, K. & JENSEN, B. A. H. 2016. FFAR4 (GPR120) Signaling Is Not Required for Anti-Inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects of Omega-3 Fatty Acids. *Mediators of Inflammation*.
- PARIKH, R. M. & MOHAN, V. 2012. Changing definitions of metabolic syndrome. *Indian J Endocrinol Metab*, 16, 7-12.
- PATTERSON, A. D., SHAH, Y. M., MATSUBARA, T., KRAUSZ, K. W. & GONZALEZ, F. J. 2012. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha

- induction of uncoupling protein 2 protects against acetaminophen-induced liver toxicity. *Hepatology*, 56, 281-290.
- PAWLAK, M., LEFEBVRE, P. & STAELS, B. 2015. Molecular mechanism of PPAR alpha action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, 62, 720-733.
- PEDERSEN, B. K. & FEBBRAIO, M. A. 2012. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nature Reviews Endocrinology*, 8, 457-465.
- PEDERSEN, D. J., GUILHERME, A., DANAI, L. V., HEYDA, L., MATEVOSSIAN, A., COHEN, J., NICOLORO, S. M., STRAUBHAAR, J., NOH, H. L., JUNG, D. Y., KIM, J. K. & CZECH, M. P. 2015. A major role of insulin in promoting obesity-associated adipose tissue inflammation. *Molecular Metabolism*, 4, 507-518.
- PERRY, R. J., CAMPOREZ, J. P. G., KURSAWE, R., TITCHENELL, P. M., ZHANG, D. Y., PERRY, C. J., JURCZAK, M. J., ABUDUKADIER, A., HAN, M. S., ZHANG, X. M., RUAN, H. B., YANG, X. Y., CAPRIO, S., KAECH, S. M., SUL, H. S., BIRNBAUM, M. J., DAVIS, R. J., CLINE, G. W., PETERSEN, K. F. & SHULMAN, G. I. 2015. Hepatic Acetyl CoA Links Adipose Tissue Inflammation to Hepatic Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Cell*, 160, 745-758.
- PETERS, J. M., CHEUNG, C. & GONZALEZ, F. J. 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and liver cancer: where do we stand? *Journal of Molecular Medicine-Jmm*, 83, 774-785.
- PETERSEN, A. M. W. & PEDERSEN, B. K. 2005. The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of Applied Physiology*, 98, 1154-1162.
- PETERSEN, K. F., DUFOUR, S., SAVAGE, D. B., BILZ, S., SOLOMON, G., YONEMITSU, S., CLINE, G. W., BEFROY, D., ZEMANY, L., KAHN, B. B., PAPADEMETRIS, X., ROTHMAN, D. L. & SHULMAN, G. I. 2007. The role of skeletal muscle insulin resistance in the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 12587-12594.
- PISCITELLI, F., CARTA, G., BISOGNO, T., MURRU, E., CORDEDDU, L., BERGE, K., TANDY, S., COHN, J. S., GRIINARI, M., BANNI, S. & DI MARZO, V. 2011. Effect of dietary krill oil supplementation on the endocannabinoidome of metabolically relevant tissues from high-fat-fed mice. *Nutr Metab (Lond)*, 8, 51.
- PLOMGAARD, P., FISCHER, C. P., IBFELT, T., PEDERSEN, B. K. & VAN HALL, G. 2008. Tumor necrosis factor-alpha modulates human in vivo lipolysis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93, 543-549.
- PRENTKI, M., MATSCHINSKY, F. M. & MADIRAJU, S. R. M. 2013. Metabolic Signaling in Fuel-Induced Insulin Secretion. *Cell Metabolism*, 18, 162-185.
- PRIEUR, X., LESNIK, P., MOREAU, M., RODRIGUEZ, J. C., DOUCET, C., CHAPMAN, M. J. & HUBY, T. 2009. Differential regulation of the human versus the mouse apolipoprotein AV gene by PPARalpha Implications for the study of pharmaceutical modifiers of hypertriglyceridemia in mice. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791, 764-771.
- RAKSHSHANDEHROO, M., HOOIVELD, G., MULLER, M. & KERSTEN, S. 2009. Comparative Analysis of Gene Regulation by the Transcription Factor PPAR alpha between Mouse and Human. *Plos One*, 4.
- RAMKHELAWON, B., HENNESSY, E. J., MENAGER, M., RAY, T. D., SHEEDY, F. J., HUTCHISON, S., WANSCHER, A., OLDEBEKEN, S., GEOFFRION, M., SPIRO, W., MILLER, G., MCPHERSON, R., RAYNER, K. J. & MOORE, K. J. 2014. Netrin-1 promotes adipose tissue macrophage retention and insulin resistance in obesity. *Nature Medicine*, 20, 377-+.

- RAMPRASATH, V. R., EYAL, I., ZCHUT, S., SHAFAT, I. & JONES, P. J. H. 2015. Supplementation of krill oil with high phospholipid content increases sum of EPA and DHA in erythrocytes compared with low phospholipid krill oil. *Lipids in Health and Disease*, 14.
- REAVEN, G. M. 1988. Role of Insulin Resistance in Human-Disease. *Diabetes*, 37, 1595-1607.
- REYNISDOTTIR, S., ELLERFELDT, K., WAHRENBERG, H., LITHELL, H. & ARNER, P. 1994. MULTIPLE LIPOLYSIS DEFECTS IN THE INSULIN-RESISTANCE (METABOLIC) SYNDROME. *Journal of Clinical Investigation*, 93, 2590-2599.
- ROBERTSON, R. P., HARMON, J., TRAN, P. O. T. & POITOUT, V. 2004. beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes*, 53, S119-S124.
- ROCHA, D. M., CALDAS, A. P., OLIVEIRA, L. L., BRESSAN, J. & HERMSDORFF, H. H. 2016. Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response. *Atherosclerosis*, 244, 211-215.
- RODEN, M. 2004. How free fatty acids inhibit glucose utilization in human skeletal muscle. *News in Physiological Sciences*, 19, 92-96.
- ROSSMEISL, M., JILKOVA, Z. M., KUDA, O., JELENIK, T., MEDRIKOVA, D., STANKOVA, B., KRISTINSSON, B., HARALDSSON, G. G., SVENSEN, H., STOKNES, I., SJOVALL, P., MAGNUSSON, Y., BALVERS, M. G., VERHOECKX, K. C., TVRZICKA, E., BRYHN, M. & KOPECKY, J. 2012. Metabolic effects of n-3 PUFA as phospholipids are superior to triglycerides in mice fed a high-fat diet: possible role of endocannabinoids. *PLoS One*, 7, e38834.
- SALMA, W., FRANEKOVA, V., LUND, T., HOPER, A., LUDVIGSEN, S., LUND, J., AASUM, E., YTREHUS, K., BELKE, D. D. & LARSEN, T. S. 2016. Dietary Calanus oil antagonizes angiotensin II-induced hypertension and tissue wasting in diet-induced obese mice. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 108, 13-21.
- SANDERSON, L. M., DE GROOT, P. J., HOOIVELD, G., KOPPEN, A., KALKHOVEN, E., MULLER, M. & KERSTEN, S. 2008. Effect of Synthetic Dietary Triglycerides: A Novel Research Paradigm for Nutrigenomics. *Plos One*, 3.
- SANDERSON, L. M., DEGENHARDT, T., KOPPEN, A., KALKHOVEN, E., DESVERGNE, B., MULLER, M. & KERSTEN, S. 2009. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor beta/delta (PPAR beta/delta) but Not PPAR alpha Serves as a Plasma Free Fatty Acid Sensor in Liver. *Molecular and Cellular Biology*, 29, 6257-6267.
- SARTIPY, P. & LOSKUTOFF, D. J. 2003. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 7265-70.
- SCHUCHARDT, J. P., SCHNEIDER, I., MEYER, H., NEUBRONNER, J., VON SCHACKY, C. & HAHN, A. 2011. Incorporation of EPA and DHA into plasma phospholipids in response to different omega-3 fatty acid formulations - a comparative bioavailability study of fish oil vs. krill oil. *Lipids in Health and Disease*, 10.
- SHANIK, M. H., XU, Y. P., SKRHA, J., DANKNER, R., ZICK, Y. & ROTH, J. 2008. Insulin Resistance and Hyperinsulinemia Is hyperinsulinemia the cart or the horse? *Diabetes Care*, 31, S262-S268.
- SHARMA, R. B. & ALONSO, L. C. 2014. Lipotoxicity in the Pancreatic Beta Cell: Not Just Survival and Function, but Proliferation as Well? *Current Diabetes Reports*, 14.

- SHI, H., KOKOEVA, M. V., INOUE, K., TZAMELI, I., YIN, H. & FLIER, J. S. 2006. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*, 116, 3015-25.
- SHOCKLEY, K. R., WITMER, D., BURGESS-HERBERT, S. L., PAIGEN, B. & CHURCHILL, G. A. 2009. Effects of atherogenic diet on hepatic gene expression across mouse strains. *Physiological Genomics*, 39, 172-182.
- SIMONEN, P., KOTRONEN, A., HALLIKAINEN, M., SEVASTIANOVA, K., MAKKONEN, J., HAKKARAINEN, A., LUNDBOM, N., MIETTINEN, T. A., GYLLING, H. & YKI-JARVINEN, H. 2011. Cholesterol synthesis is increased and absorption decreased in non-alcoholic fatty liver disease independent of obesity. *Journal of Hepatology*, 54, 153-159.
- SIMOPOULOS, A. P. 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother*, 56, 365-79.
- SIMOPOULOS, A. P. 2016. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients*, 8.
- SISCOVICK, D. S., BARRINGER, T. A., FRETTS, A. M., WU, J. H., LICHTENSTEIN, A. H., COSTELLO, R. B., KRIS-ETHERTON, P. M., JACOBSON, T. A., ENGLER, M. B., ALGER, H. M., APPEL, L. J. & MOZAFFARIAN, D. 2017. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid (Fish Oil) Supplementation and the Prevention of Clinical Cardiovascular Disease: A Science Advisory From the American Heart Association. *Circulation*, 135, e867-e884.
- STENEBERG, R., RUBINS, N., BARTOOV-SHIFMAN, R., WALKER, M. D. & EDLUND, H. 2005. The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse. *Cell Metabolism*, 1, 245-258.
- STEPHENS, F. B., CHEE, C., WALL, B. T., MURTON, A. J., SHANNON, C. E., VAN LOON, L. J. C. & TSINTZAS, K. 2015. Lipid-Induced Insulin Resistance Is Associated With an Impaired Skeletal Muscle Protein Synthetic Response to Amino Acid Ingestion in Healthy Young Men. *Diabetes*, 64, 1615-1620.
- STIENSTRA, R., SAUDALE, F., DUVAL, C., KESHTKAR, S., GROENER, J. E. M., VAN ROOIJEN, N., STAELS, B., KERSTEN, S. & MULLER, M. 2010. Kupffer Cells Promote Hepatic Steatosis Via Interleukin-1 beta-Dependent Suppression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha Activity. *Hepatology*, 51, 511-522.
- SUN, K., KUSMINSKI, C. M. & SCHERER, P. E. 2011. Adipose tissue remodeling and obesity. *Journal of Clinical Investigation*, 121, 2094-2101.
- SVENSON, K. L., VON SMITH, R., MAGNANI, P. A., SUETIN, H. R., PAIGEN, B., NAGGERT, J. K., LI, R. H., CHURCHILL, G. A. & PETERS, L. L. 2007. Multiple trait measurements in 43 inbred mouse strains capture the phenotypic diversity characteristic of human populations. *Journal of Applied Physiology*, 102, 2369-2378.
- TANDE, K. S., VO, T. D. & LYNCH, B. S. 2016. Clinical safety evaluation of marine oil derived from *Calanus finmarchicus*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 80, 25-31.
- THIES, F., GARRY, J. M. C., YAQOUB, P., RERKASEM, K., WILLIAMS, J., SHEARMAN, C. P., GALLAGHER, P. J., CALDER, P. C. & GRIMBLE, R. F. 2003. Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial. *Lancet*, 361, 477-485.
- TURNER, N., KOWALSKI, G. M., LESLIE, S. J., RISIS, S., YANG, C., LEE-YOUNG, R. S., BABB, J. R., MEIKLE, P. J., LANCASTER, G. I., HENSTRIDGE, D. C.,

- WHITE, P. J., KRAEGEN, E. W., MARETTE, A., COONEY, G. J., FEBBRAIO, M. A. & BRUCE, C. R. 2013. Distinct patterns of tissue-specific lipid accumulation during the induction of insulin resistance in mice by high-fat feeding. *Diabetologia*, 56, 1638-1648.
- UYSAL, K. T., WIESBROCK, S. M., MARINO, M. W. & HOTAMISLIGIL, G. S. 1997. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature*, 389, 610-614.
- VAN ROOYEN, D. M., LARTER, C. Z., HAIGH, W. G., YEH, M. M., IOANNOU, G., KUEVER, R., LEE, S. P., TEOH, N. C. & FARRELL, G. C. 2011. Hepatic Free Cholesterol Accumulates in Obese, Diabetic Mice and Causes Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*, 141, 1393-U850.
- WANG, F., HAN, L. L. & HU, D. Y. 2017. Fasting insulin, insulin resistance and risk of hypertension in the general population: A meta-analysis. *Clinica Chimica Acta*, 464, 57-63.
- WANG, T., SI, Y. G., SHIRIHAI, O. S., SI, H. Q., SCHULTZ, V., CORKEY, R. F., HU, L. P., DEENEY, J. T., GUO, W. & CORKEY, B. E. 2010. Respiration in Adipocytes is Inhibited by Reactive Oxygen Species. *Obesity*, 18, 1493-1502.
- WEAVER, J. R., HOLMAN, T. R., IMAI, Y., JADHAV, A., KENYON, V., MALONEY, D. J., NADLER, J. L., RAI, G., SIMEONOV, A. & TAYLOR-FISHWICK, D. A. 2012. Integration of pro-inflammatory cytokines, 12-lipoxygenase and NOX-1 in pancreatic islet beta cell dysfunction. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 358, 88-95.
- WEISBERG, S. P., MCCANN, D., DESAI, M., ROSENBAUM, M., LEIBEL, R. L. & FERRANTE, A. W., JR. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, 112, 1796-808.
- WILLSON, T. M., BROWN, P. J., STERNBACH, D. D. & HENKE, B. R. 2000. The PPARs: From orphan receptors to drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43, 527-550.
- WU, H. Z. & BALLANTYNE, C. M. 2017. Skeletal muscle inflammation and insulin resistance in obesity. *Journal of Clinical Investigation*, 127, 43-54.
- YAMAGUCHI, K., YANG, L., MCCALL, S., HUANG, J. W., YU, X. X., PANDEY, S. K., BHANOT, S., MONIA, B. P., LI, Y. X. & DIEHL, A. M. 2007. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 45, 1366-1374.
- YANG, G., BADEANLOU, L., BIELAWSKI, J., ROBERTS, A. J., HANNUN, Y. A. & SAMAD, F. 2009. Central role of ceramide biosynthesis in body weight regulation, energy metabolism, and the metabolic syndrome. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 297, E211-E224.
- YANG, Q., NAGANO, T., SHAH, Y., CHEUNG, C., ITO, S. & GONZALEZ, F. J. 2008. The PPAR alpha-humanized mouse: A model to investigate species differences in liver toxicity mediated by PPAR alpha. *Toxicological Sciences*, 101, 132-139.
- YOKOTA, T., ORITANI, K., TAKAHASHI, I., ISHIKAWA, J., MATSUYAMA, A., OUCHI, N., KIHARA, S., FUNAHASHI, T., TENNER, A. J., TOMIYAMA, Y. & MATSUZAWA, Y. 2000. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood*, 96, 1723-1732.